

SYNTHESE, STOFFWECHSEL UND EIGENSCHAFTEN VON  
SCHWEFEL- UND SELENHALTIGEN NICOTINSÄUREAMID-  
ANTIMETABOLITEN UND NADP<sup>+</sup>-ANALOGEN  
SOWIE COENZYM-MODELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereiches Chemie  
der Freien Universität Berlin

1971

vorgelegt von

Wolfram Christ  
aus Tübingen



SYNTHESE, STOFFWECHSEL UND EIGENSCHAFTEN VON  
SCHWEFEL- UND SELENHALTIGEN NICOTINSÄUREAMID-  
ANTIMETABOLITEN UND  $\text{NADP}^+$ -ANALOGEN  
SOWIE COENZYM-MODELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereiches Chemie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfram Christ

aus Tübingen

1. Referent : Professor Dr. H. COPER
2. Referent : Professor Dr. G. MANECKE



Tag der mündlichen Prüfung: 5. April 1971

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin begonnen und am Institut für Neuropsychopharmakologie zu Ende geführt.

Herrn Professor Dr. Helmut COPER möchte ich für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, sehr herzlich danken.

Für die Durchführung der Elementaranalysen und die Aufnahme der Infrarot-, Kernresonanz- sowie Massenspektren der selenhaltigen Substanzen bin ich der SCHERING' AG, Berlin, zu Dank verpflichtet.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                    | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Enzyme                                                                                                                             | 1     |
| Verzeichnis der Abkürzungen                                                                                                        | 2     |
| <br><u>KAPITEL I</u>                                                                                                               |       |
| Einleitung                                                                                                                         | 4     |
| 1. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften<br>des Thionicotinamids                                                         | 8     |
| 2. $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge des Thionicotinamids                                                                                 | 9     |
| 3. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften<br>des 6-Aminonicotinsäureamids (6-AN)                                          | 14    |
| 4. $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge des 6-Aminonicotinamids                                                                              | 16    |
| 5. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften<br>des 6-Aminonicotinsäurethioamids (6-ATN)                                     | 16    |
| 6. $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge und Modellsubstanzen des 6-Amino-<br>nicotinsäurethioamids                                           | 17    |
| 7. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften<br>des Nicotinsäureselenoamids (Seleno-NA)                                      | 18    |
| 8. $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge und Coenzym-Modellsubstanzen des<br>Selenonicotinamids                                               | 21    |
| 9. Citrat-Gehalt in Gehirn und Leber nach Seleno-<br>nicotinamid-Gaben                                                             | 21    |
| 10. Zusammenfassung der Toxizität, Coenzym-Analogen-<br>bildung und Verstoffwechselung einiger Antimetaboliten<br>des Nicotinamids | 24    |

|                                                                                                  | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| b) Dephosphorylierung von 3-AcPyrADP <sup>+</sup> zu 3-AcPyrAD <sup>+</sup>                      | 56    |
| c) Dephosphorylierung von 3-OHCPyrADP <sup>+</sup> zu 3-OHCPyrAD <sup>+</sup>                    | 57    |
| d) Reaktion von Seleno-NADP <sup>+</sup> mit der alkalischen Phosphatase                         | 58    |
| Substituenten in 3-Stellung am Pyridin-Ring und ihre Beziehung zur Coenzym-Funktion der Analogen | 61    |

### KAPITEL III

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Coenzym-Modellsubstanzen                                                                                                                           | 69 |
| 2. Hydrierbarkeit der Modellsubstanzen                                                                                                                | 70 |
| 3. Zur Synthese von Carbonsäure-Thioamiden und -Selenoamiden des Pyridins, deren N <sup>1</sup> -Methyl-derivaten und einigen S-Oxiden sowie N-Oxiden | 75 |
| 4. Anmerkungen zu den Infrarot-Spektren der Pyridin-carbonsäurethioamide und -selenoamide,<br>(Zum Problem der Onamid/Oblimid-Tautomerie)             | 80 |

### KAPITEL IV

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Methoden                                                                                    | 87 |
| 1. Darstellung von Aconitase aus Schweineherz                                               | 87 |
| 2. Gewinnung cytoplasmatischer NADP <sup>+</sup> -abhängiger Oxidoreduktasen aus Rattenhirn | 88 |

|     |                                                                                                                  |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.  | NAD(P) <sup>+</sup> -Abbau (Hydrolyse) durch die Glycohydrolase (EC 3. 2. 2. 6) aus Hirnmikrosomen               | 89  |
| 4.  | Herstellung von Rattenmilzmikrosomen als Glycohydrolasequelle (EC 3. 2. 2. 6)                                    | 92  |
|     | Herstellung von NADP <sup>+</sup> -Analogen mit Hilfe der Glycohydrolase (EC 3. 2. 2. 6) aus Milzmikrosomen.     | 92  |
| a)  | Herstellung von 6-Aminonicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (6-ANADP <sup>+</sup> )                           | 93  |
| b)  | Herstellung von Thionicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (Thio-NADP <sup>+</sup> )                            | 94  |
| c)  | Darstellung von Selenonicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (Seleno-NADP <sup>+</sup> )                        | 95  |
| d)  | Versuch der Herstellung von 6-Aminothionicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (6-Amino-Thio-NADP <sup>+</sup> ) | 98  |
| e)  | Herstellung des 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat (3-AcPyrADP <sup>+</sup> )                           | 98  |
| f)  | Darstellung des Pyridin-3-carbaldehyd-adenin-dinucleotid-phosphat (3-OHCPyrADP <sup>+</sup> )                    | 99  |
| g)  | Darstellung von Isonicotinsäurethioamid-adenin-dinucleotid-phosphat (Isothio-NADP <sup>+</sup> )                 | 99  |
| 5.  | Säulenchromatographie                                                                                            | 101 |
| a)  | Ionenaustauschchromatographie                                                                                    | 101 |
| aa) | Dowex-Ionenaustauscher                                                                                           |     |
| b)  | Gelchromatographie (Sephadex)                                                                                    | 102 |

|     |                                                                                                  |     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.  | Papierchromatographie der Pyridinnucleotide                                                      | 103 |
| 7.  | Dünnschichtchromatographie der Pyridinnucleotide                                                 | 105 |
| 8.  | Hochspannungselektrophorese                                                                      | 107 |
| 9.  | Identifizierung der Nucleotide                                                                   | 108 |
|     | a) Aufzeichnung der UV-Spektren                                                                  | 108 |
|     | b) Phosphat- und Ribose-Bestimmungen                                                             | 109 |
|     | ba) Kolorimetrische Bestimmung des Phosphatanteils                                               | 109 |
|     | bb) Kolorimetrische Bestimmung des Riboseanteils                                                 | 110 |
|     | c) Hydrolyse der $\text{NADP}^+$ -Analoge                                                        | 114 |
| 10. | Synthese von $\text{NADP}^+$ -Analoge in vivo                                                    | 115 |
|     | a) Applikation der Nicotinamid-Antimetaboliten                                                   | 115 |
|     | b) Bestimmung der oxydierten Pyridinnucleotide                                                   | 116 |
|     | c) Bestimmung der reduzierten Pyridinnucleotide                                                  | 118 |
| 11. | Citrat-Bestimmung                                                                                | 120 |
| 12. | Berechnung der Gewebe-Konzentration an $\text{NAD(P)}^+$ , Thio-<br>$\text{NAD(P)}^+$ und Citrat | 121 |
| 13. | Testansätze zur Enzymkinetik mit Dehydrogenasen                                                  | 122 |
|     | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase                                                                 | 122 |
|     | Isocitrat-Dehydrogenase                                                                          | 123 |
|     | 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase                                                                 | 124 |
|     | Glutathion-Reduktase                                                                             | 124 |
|     | Leber-Alkohol-Dehydrogenase                                                                      | 125 |
| 14. | Enzymatische Untersuchungen mit der alkalischen<br>Phosphatase                                   | 125 |

KAPITEL II

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>NAD<sup>+</sup>- und NADP<sup>+</sup>-Analoge</u>                                                                                   | 27 |
| Vergleich von Thio-NADP <sup>+</sup> und Seleno-NADP <sup>+</sup> in cytoplasmatischen NADP <sup>+</sup> -abhängigen Oxidoreduktasen   | 30 |
| Vergleich von Thio-NADP <sup>+</sup> und Seleno-NADP <sup>+</sup> in käuflich erworbenen NADP <sup>+</sup> -abhängigen Oxidoreduktasen | 38 |
| 1. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase                                                                                                    | 38 |
| 2. Phosphogluconat-Dehydrogenase                                                                                                       | 39 |
| 3. Isocitrat-Dehydrogenase                                                                                                             | 40 |
| 4. Glutathion-Reduktase                                                                                                                | 41 |
| 5. Alkohol-Dehydrogenase (Pferdeleber)                                                                                                 | 44 |
| 6. L-Xylulose-Reduktase                                                                                                                | 44 |
| 7. Chemische Reduktion von Thio-NADP <sup>+</sup> und Seleno-NADP <sup>+</sup> mit NaBH <sub>4</sub>                                   | 45 |
| Diskussion der Coenzymaktivität von Thio-NADP <sup>+</sup> und Seleno-NADP <sup>+</sup> in verschiedenen Dehydrogenase-Systemen        | 47 |
| Zur Coenzym-Stereospezifität der untersuchten Dehydrogenasen                                                                           | 50 |
| Versuche zur enzymatischen Dephosphorylierung von NADP <sup>+</sup> -Analogen durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm          | 52 |
| a) Dephosphorylierung von NADP <sup>+</sup> zu NAD <sup>+</sup> und von Thio-NADP <sup>+</sup> zu Thio-NAD <sup>+</sup>                | 53 |

KAPITEL V

|                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Theoretische Überlegungen zur Kinetik enzymatisch<br>katalysierter Reaktionen                               | 128 |
| Die Formulierung der Gleichung für die Initialgeschwin-<br>digkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion | 128 |
| I. Ordnung                                                                                                  |     |
| Kinetik der Zwei-Substrat-Reaktion                                                                          | 134 |
| 3-Substrat-Reaktionen                                                                                       | 135 |
| Untersuchung des Hemmtyps                                                                                   | 136 |
| a) kompetitive Hemmung                                                                                      | 136 |
| b) nichtkompetitive Hemmung                                                                                 | 136 |
| c) unkompetitive Hemmung                                                                                    | 137 |

KAPITEL VI

|                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Präparative Vorschriften                                                                                    | 140 |
| <u>Allgemeines</u>                                                                                          | 140 |
| Tabelle der verwendeten Lösungsmittelsysteme für die<br>Chromatographie der Pyridinderivate                 | 141 |
| 1. Darstellung von 6-Amino-3-cyanopyridin                                                                   | 142 |
| 2. Darstellung von 6-Amino-thionicotinamid                                                                  | 147 |
| 3. Versuch der Darstellung von 6-Amino-thionicotinamid<br>durch direkte Schwefelung von 6-Amino-nicotinamid | 149 |

|                                                                                                                                                                                         | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4. - 11.      N <sup>1</sup> -Methylierung von                                                                                                                                          | 151   |
| 3-Cyanopyridin, 4-Cyanopyridin, 6-Amino-3-cyano-<br>pyridin, Nicotinsäureamid, 6-Amino-nicotinsäure-<br>amid, 6-Amino-nicotinsäurethioamid, Thionicotinamid,<br>Isonicotinsäurethioamid |       |
| 12. Nicotinsäureselenoamid                                                                                                                                                              | 161   |
| 13. Versuch der Darstellung eines Nicotinsäureseleno-<br>amid-N <sup>1</sup> -Methyljodids                                                                                              | 165   |
| 14. Versuch der Darstellung eines Nicotinsäuretelluramids                                                                                                                               | 166   |
| 15. Versuch der Darstellung eines Isonicotinsäureseleno-<br>amids                                                                                                                       | 167   |
| 16. Benzoessäureselenoamid                                                                                                                                                              | 168   |
| 17. Nicotinamid-N-oxid                                                                                                                                                                  | 172   |
| 18. 3-Cyanopyridin-N-oxid                                                                                                                                                               | 173   |
| 19. Nicotinsäurethioamid-N-oxid                                                                                                                                                         | 176   |
| 20. Nicotinsäurethioamid-S-oxid                                                                                                                                                         | 178   |
| 21. 6-Amino-nicotinsäurethioamid-S-oxid                                                                                                                                                 | 179   |
| 22. 6-Amino-nicotinamid-N-oxid                                                                                                                                                          | 181   |
| UV - Spektren                                                                                                                                                                           | 183   |
| VII. Zusammenfassung                                                                                                                                                                    | 187   |
| VIII. Literaturverzeichnis                                                                                                                                                              | 190   |

Enzyme:

Aconitase, Citrat (Isocitrat) Hydro-lyase (EC 4.2.1.3)

Alkohol-Dehydrogenase, Alkohol : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.1)

Citrat-Lyase, Citrat-Oxalacetat-Lyase (EC 4.1.3.6)

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, D-Glucose-6-phosphat :  
NADP-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.49)

Glutamat-Dehydrogenase, L-Glutamat : NAD(P)-Oxidoreduktase (des-aminierend) (EC 1.4.1.3)

Glutathion-Reduktase, reduziertes NAD(P) : Oxidiertes Glutathion-  
Oxidoreduktase (EC 1.6.4.2)

Glycerokinase, ATP : Glycerin-Phosphotransferase (EC 2.7.1.30)

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, L-Glycerin-3-phosphat :  
NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.8)

Isocitrat-Dehydrogenase, threo-D<sub>5</sub>-Isocitrat : NADP-Oxidoreduktase  
(decarboxylierend) (EC 1.1.1.42)

L(+)-Lactat-Dehydrogenase, L-Lactat : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.27)

Malat-Dehydrogenase, L-Malat : NAD-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.37)

Malic enzyme, L-Malat : NADP-Oxidoreduktase (decarboxylierend)  
(EC 1.1.1.40)

NAD(P)-Nucleosidase, NAD(P)-Glykohydrolase (EC 3.2.2.6)

Phosphatase, alkalische, Orthophosphorsäure-monoester-Phosphohydro-  
lase (EC 3.1.3.1)

6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, 6-Phospho-D-gluconat : NADP-  
Oxidoreduktase (decarboxylierend) (EC 1.1.1.44)

L-Xylulose-Reduktase, Xylit : NADP-Oxidoreduktase (L-Xylulose-  
bildend) (EC 1.1.1.10)

## Verzeichnis der Abkürzungen

|                                                                    |                                                          |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| NA                                                                 | = Nicotinsäureamid                                       |
| Thio-NA                                                            | = Nicotinsäurethioamid (Thionicotinamid)                 |
| Seleno-NA                                                          | = Nicotinsäureselenoamid                                 |
| 6-AN                                                               | = 6-Amino-nicotinsäureamid                               |
| 3-AP                                                               | = 3-Acetylpyridin                                        |
| 6-ATN                                                              | = 6-Amino-nicotinsäurethioamid                           |
|                                                                    |                                                          |
| NAD(P) <sup>+</sup>                                                | = Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-(phosphat)         |
| AcPyrAD(P) <sup>+</sup>                                            | = 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-(phosphat)          |
| (bzw. 3-APAD(P) <sup>+</sup> )                                     |                                                          |
| Thio-NAD(P) <sup>+</sup>                                           | = Nicotinsäurethioamid-adenin-dinucleotid-(phosphat)     |
| Seleno-NAD(P) <sup>+</sup>                                         | = Nicotinsäureselenoamid-adenin-dinucleotid-(phosphat)   |
| 3-OHCPyrAD(P) <sup>+</sup>                                         | = Pyridin-3-carbaldehyd-adenin-dinucleotid-(phosphat)    |
| 6-ANAD(P) <sup>+</sup>                                             | = 6-Amino-nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-(phosphat) |
| Isothio-NAD(P) <sup>+</sup>                                        | = Isonicotinsäurethioamid-adenin-dinucleotid-(phosphat)  |
|                                                                    |                                                          |
| NAD(P)H, AcPyrAD(P)H, Thio-NAD(P)H, Seleno-NAD(P)H, 3-OHCPyrAD(P)H | = entsprechende hydrierte Derivate                       |
|                                                                    |                                                          |
| DH                                                                 | = Dehydrogenase                                          |
| MDH                                                                | = Malat-Dehydrogenase                                    |
| LDH                                                                | = Lactat-Dehydrogenase                                   |
| ADH                                                                | = Alkohol-Dehydrogenase                                  |
|                                                                    |                                                          |
| FM                                                                 | = Fließmittel                                            |
| DC                                                                 | = Dünnschicht-Chromatographie                            |

## Enzymkinetik

|                 |   |                                                                                   |
|-----------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------|
| E               | = | Enzym                                                                             |
| ES              | = | Enzym-Substrat-Komplex                                                            |
| EIS             | = | Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex                                                  |
| I               | = | Inhibitor (Hemmstoff)                                                             |
| P               | = | Produkt                                                                           |
| S               | = | Substrat                                                                          |
| K               | = | Gleichgewichtskonstante                                                           |
| $K_D$ ( $K_s$ ) | = | Dissoziationskonstante                                                            |
| $K_i$           | = | Hemmkonstante (Gleichgewichtskonstante der Reaktion zwischen Hemmstoff und Enzym) |
| $K_m$           | = | Michaelis-Konstante eines Substrates oder Produktes                               |
| k               | = | Geschwindigkeitskonstante n-ter Ordnung                                           |
| v               | = | Reaktionsgeschwindigkeit                                                          |
| $v_i$           | = | Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart eines Inhibitors                            |
| $v_o$           | = | Initialgeschwindigkeit                                                            |
| $V_{max}$       | = | Sättigungsgeschwindigkeit                                                         |
| (X)             | = | Konzentration                                                                     |
| $(X)_o$         | = | Betrag der Konzentration beim Start der Reaktion                                  |
| $(X)_t$         | = | Betrag der Konzentration im Zeitpunkt t der Reaktion                              |
| ...H            | = | betrifft die Hinreaktion                                                          |

## Kapitel I

### EINLEITUNG

Im Jahre 1936 erkannten sowohl von Euler, Adler, Hellström, Albers und Schlenk als auch Warburg, Christian und Griese, daß "Cozymase" und auch das "wasserstoffübertragende Coenzym" chemisch eng verwandt sind und Dinucleotide darstellen, die Adenin und Nicotinsäureamid enthalten. Die Verbindungen unterschieden sich lediglich im Phosphatgehalt; während die Cozymase 2 Phosphate pro Molekül enthält, besitzt das "wasserstoffübertragende Coenzym" 3 Phosphate. Warburg und Christian bezeichneten deshalb die Cozymase als "Diphosphopyridinnucleotid" und das von ihnen entdeckte Coenzym als "Triphosphopyridinnucleotid". (1 - 9)

In ihren grundlegenden Arbeiten konnten Warburg und Christian (3, 4) zeigen, daß beide Coenzyme bei den biologischen Oxidations-Reduktions-Reaktionen katalytisch beteiligt sind. Diesen Untersuchungen ist auch die Erkenntnis zu verdanken, daß die Dehydrierung zahlreicher Substanzen in der lebenden Zelle auf einer reversiblen Umwandlung von Pyridinium-Salzen in Dihydropyridine beruht.

Obwohl die Bausteine der Coenzyme  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$ , Nicotinsäureamid bzw. Nicotinsäure, von fundamentaler Bedeutung für den lebenden Organismus sind, können sie vom Menschen nicht in ausreichendem Umfang gebildet werden (z. B. aus Tryptophan). Nicotinsäure und Nicotinsäureamid sind daher Vitamine. Sie sind gleich wirksam, denn die de novo-Synthese von  $\text{NAD}^+$  verläuft zumindest in der Leber vom Nicotinamid über Nicotinsäure, Nicotinsäuremononucleotid und Nicotinsäure-adenin-dinucleotid (Deamido  $\text{NAD}^+$ ). (10, 11)

$\text{NADP}^+$  wird schließlich mit Hilfe der NAD-Kinase aus  $\text{NAD}^+$  synthetisiert. (12 - 15)

Schema des Stoffwechsels von Nicotinsäureamid

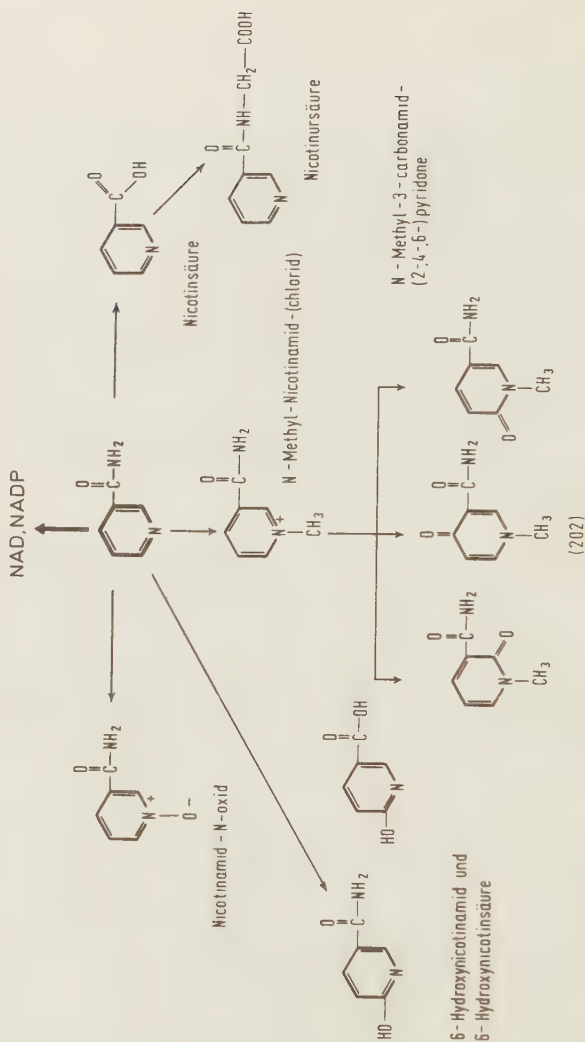


Abb. 1

Neben dieser de novo-Synthese der beiden Pyridin-Coenzyme existiert ein weiterer Weg, auf dem Nicotinamid (z. B.  $^{14}\text{C}$ -NA) direkt durch eine Austauschreaktion mit Hilfe der NAD(P)-Glykohydrolase auf  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  transferiert werden kann. (16, 17) Dieses an die Mikrosomen gebundene Enzym ist in vielen Säugetierorganen vorhanden und ist so unspezifisch, daß in vitro und in vivo nicht nur Nicotinamid, sondern auch andere substituierte Pyridinderivate und sogar einige heterocyclische Systeme transferiert werden können. (18 - 22)

Das Schicksal des Nicotinamids im Organismus ist heute weitgehend geklärt. Nach intraperitonealer Injektion von 7- $^{14}\text{C}$ -Nicotinamid lassen sich aus dem Urin folgende Metaboliten isolieren: Nicotinamid-N-oxid, Nicotinsäure, Nicotinamid,  $\text{N}^1$ -Methylnicotinamid,  $\text{N}^1$ -methyl-2-pyridon-5-carboxamid,  $\text{N}^1$ -methyl-4-pyridon-3-carboxamid, Nicotinursäure, 6-Hydroxynicotinamid und 6-Hydroxynicotinsäure. (23 - 26) (vgl. Abb. 1)

Die beiden letzten wurden erst vor kurzem als Stoffwechselprodukte des Nicotinamids entdeckt (vgl. Schema). (26)

Von Tierart zu Tierart bestehen qualitative Unterschiede. So werden bei der Maus ca. 30 - 50 % als unverändertes Nicotinamid, 37 - 50 % als Nicotinamid-N-oxid und ca. 3 - 7,5 % als  $\text{N}^1$ -Methylnicotinamid ausgeschieden. (23)

Beim Menschen sind  $\text{N}^1$ -Methylnicotinamid,  $\text{N}^1$ -methyl-2-pyridon-5-carboxamid und Nicotinursäure die Hauptmetaboliten. (27 - 31)

Nicotinamid ist praktisch ungiftig. Die  $\text{LD}_{50}$  für Nicotinamid liegt bei der Maus bei 4,5 g/kg oral und bei 2,5 g/kg i. v.. Veit fand eine mittlere tödliche Dosis von 4,73 g/kg Nicotinamid bei Ratten nach intravenöser Dauerinfusion. (31, 32)

In Langzeitversuchen tolerieren Ratten eine Dosis von 1 g/kg (Versuchsdauer - 40 Tage), ohne toxische Erscheinungen. Hunde vertrugen sogar eine tägliche Gabe von 2 g/kg über 35 Tage. (31)

Es gibt eine große Zahl dem Nicotinamid nahe verwandter (33 - 35) Verbindungen - darunter auch therapeutisch verwendete Substanzen - die zum Teil Vitamin-, zu einem größeren Teil aber Antivitamin-Wirkung besitzen. Eine ganze Anzahl dieser sogenannten Antimetaboliten des Nicotinamids kann zumindest in vitro enzymatisch an Stelle des Nicotinamid-Restes in  $\text{NAD(P)}^+$  eingebaut werden. Die Möglichkeit einer Synthese "falsch" strukturierter Pyridinnucleotide beruht auf der geringen Spezifität der  $\text{NAD(P)}$ -Glykohydrolase. Ob die Antimetaboliten aber in die Zellen einzudringen vermögen und auch in vivo Pyridinnucleotid-Analoga bilden, ist bisher erst an wenigen Beispielen untersucht. Dazu gehören das 3-Acetylpyridin, das 6-Aminonicotinamid sowie das 1, 2, 3-Thiadiazol. (36 - 39)

In der vorliegenden Arbeit sollen die Synthese, der Stoffwechsel und Eigenschaften von schwefel- und selenhaltigen Nicotinamid-Antimetaboliten und  $\text{NADP}^+$ -Analogen sowie Coenzym-Modellen beschrieben werden. Die Untersuchungen sollen auch dazu dienen, die Wechselwirkungen zwischen einigen Dehydrogenasen und dem Coenzym zu studieren, wenn der Sauerstoff in der Carboxamid-Gruppe des Nicotinamids im  $\text{NAD(P)}^+$  durch Schwefel, Selen oder Tellur ersetzt wird, also durch Elemente mit geringerer Elektronegativität (vgl. Tab. 1). (40)

Tabelle 1

| Element | Elektronegativität | Radien ( $\text{\AA}$ ) in Doppelbindungen |
|---------|--------------------|--------------------------------------------|
| O       | 3,5                | 0,62                                       |
| N       | 3,0                | 0,62                                       |
| S       | 2,5                | 0,94                                       |
| Se      | 2,4                | 1,07                                       |
| Te      | 2,1                | 1,27                                       |
| C       | 2,5                |                                            |

Es wäre denkbar, daß infolge des geringeren positivierenden induktiven Effektes der Carbonsäurethioamid- bzw. -selenoamid-Gruppe die Coenzym-Aktivität der  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge sich im Vergleich zu den natürlichen Coenzymen verringern würde.

#### 1. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des Thionicotinamids

Die Synthese von Thionicotinamid wurde 1945 von Karrer und Schukri beschrieben. Über ein eventuelles natürliches Vorkommen ist nichts bekannt. (41)

Eine einmalige Dosis von 500 mg/kg per os vertragen Ratten ohne Schaden. Der Ersatz des Sauerstoffes durch Schwefel in der Carboxamid-Gruppe des Nicotinamids erhöht demnach die Toxizität nicht. Ob Thionicotinamid jedoch Vitamincharakter hat, ist noch nicht untersucht. Rist et al. finden auch bei dem chemisch eng verwandten Pyridin-4-carbonsäurethioamid nur eine  $\text{LD}_{50}$  von 1.000 mg/kg bei der Maus (Akutversuch). Nach den Untersuchungen dieser Autoren verträgt die Maus ohne nachweisbare Schädigung eine chronische Dosis von 250 mg/kg/die Isonicotinsäurethioamid (Versuchsdauer - 40 Tage). (42 - 44)

Die Biotransformation des Thionicotinamids ist bisher nur teilweise geklärt. Nach Verabreichung per os konnten im Rattenurin erst zwei Metaboliten sicher identifiziert werden: unverändertes Thionicotinamid und Thionicotinamid-S-oxid. Der Urin wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die UV-Spektren der eluierten Metaboliten mit Referenzsubstanzen (vgl. präparativer Teil) verglichen.

## 2. NAD(P)<sup>+</sup>-Analoge des Thionicotinamids

Thionicotinamid wird in vitro mit Hilfe der NAD(P)-Glycohydrolase rasch und mit guter Ausbeute auf NAD(P)<sup>+</sup> transferiert. Die Synthese der Coenzym-Modells substanz, des Thionicotinamid-N-methyljodids, ist 1963 von Shifrin erstmals publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Syntheseweg beschrieben. Die Modells substanz ist durch Dithionit und NABH<sub>4</sub> hydrierbar. (34, 45 - 47)

Auch in vivo wird Thionicotinamid zu unphysiologischen NAD(P)<sup>+</sup>-Analogen synthetisiert. (48)

Untersuchungen über den Gehalt an Analogen im Gehirn und in der Leber von Ratten, die mit 250 mg/kg Thio-NA behandelt waren, haben ergeben, daß schon nach 6 Stunden ca. 9 % Thio-NAD<sup>+</sup> und bis zu 20 % Thio-NADP<sup>+</sup> gebildet wurden. Der höchste Thio-NAD<sup>+</sup>-Gehalt (14 - 17 %) wird dagegen erst nach 17 - 20 Std. nach Applikation des Antimetaboliten gefunden und fällt nach dieser Zeit wieder ab. (vgl. Tab. 2a, 2b)

Sowohl in der Leber als auch im Gehirn erreicht der Anteil des Thio-NAD<sup>+</sup> am Gesamt-NAD<sup>+</sup>-Gehalt maximal 17 %. Der Anteil des Thio-NADP<sup>+</sup> an der Gesamtsumme der Triphosphopyridinnucleotide beträgt in der Leber kaum mehr als 17 % und im Gehirn im Gegensatz zu den Befunden mit anderen Antimetaboliten wie 3-AP oder 6-AN (22) kaum mehr als 30 %. 24 h nach einer einmaligen Thio-NA-Gabe sind in der Leber noch etwa 11 % Thio-NADP<sup>+</sup> vorhanden, während im Gehirn der Thio-NADP<sup>+</sup>-Gehalt nach diesem Zeitraum noch auf dem hohen Niveau von knapp 30 % verbleibt. (vgl. Tab. 2, 3). Die relativ geringe Umwandlung von NADP<sup>+</sup> zu Thio-NADP<sup>+</sup> könnte darauf beruhen, daß Thio-NADP<sup>+</sup> - im Gegensatz zum 3-APADP<sup>+</sup> und 6-ANADP<sup>+</sup> - durch die NAD(P)-Glycohydrolase mit der gleichen Geschwindigkeit hydrolysiert wird wie NADP<sup>+</sup> (vgl. Tab. 4).

Gehalt an  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , Thio- $\text{NAD}^+$  sowie Thio- $\text{NADP}^+$  (in  $\text{nMol/g}$  Feuchtgewicht) in Leber und Gehirn von Ratten  
( $n = 4 - 8$ ), die mit  $250 \text{ mg/kg}$  Nicotinsäurethioamid (Thio-NA) vorbehandelt wurden.

Tabelle 2a

| Stunden nach<br>Thio-NA-<br>Applikation | L e b e r      |                 |                      |                          | G e h i r n    |                 |                      |                          |
|-----------------------------------------|----------------|-----------------|----------------------|--------------------------|----------------|-----------------|----------------------|--------------------------|
|                                         | $\text{NAD}^+$ | $\text{NADP}^+$ | Thio- $\text{NAD}^+$ | Thio-<br>$\text{NADP}^+$ | $\text{NAD}^+$ | $\text{NADP}^+$ | Thio- $\text{NAD}^+$ | Thio-<br>$\text{NADP}^+$ |
| 4                                       | $542 \pm 31$   | 40              | $38 \pm 2$           | $4,24$                   | $300 \pm 15$   |                 | 22                   |                          |
| 5 1/2                                   |                | $42 \pm 4$      |                      | $1,2 \pm 0,2$            | 295            | $11,4 \pm 1,2$  | $29 \pm 1$           | $2 \pm 1$                |
| 9 3/4                                   | $606 \pm 34$   | $45,6 \pm 4,4$  | $70,7 \pm 4$         | $5,72 \pm 0,7$           | $276 \pm 16$   | $6 \pm 1,2$     | $36 \pm 1,6$         | $7,2 \pm 0,4$            |
| 17                                      | $704 \pm 75$   | $42 \pm 4,5$    | $74 \pm 26,5$        | $5,9 \pm 2,5$            | $251 \pm 31$   | $13,7 \pm 3,0$  | $42,8 \pm 6$         | $5,0 \pm 0,8$            |
| 20                                      | $560 \pm 87$   | $40 \pm 7$      | $95 \pm 22$          | $5,1 \pm 0,9$            | $243 \pm 7$    | $11,8 \pm 1$    | $47 \pm 3$           | $5,4 \pm 0,7$            |
| 24                                      | $627 \pm 83$   | $39,3 \pm 5,9$  | $44 \pm 6,4$         | $4,3 \pm 0,3$            | 260            | 11,7            | 32                   | 4,4                      |

Fehlerabschätzung: Die Thio- $\text{NAD}^+$ -Bestimmungen sind mit einem Fehler von  $4 - 22 \%$  und die Thio- $\text{NADP}^+$ -Bestimmungen mit einem Fehler von  $18 - 50 \%$  behaftet, je nach der absoluten Größe der Werte.

Prozentualer Gehalt von Thio-NAD<sup>+</sup> und Thio-NADP<sup>+</sup> an der Gesamtsumme der Coenzyme in Leber und Gehirn von Ratten, die mit 250 mg/kg Nicotinsäurethioamid (Thio-NA) vorbehandelt wurden.

Tabelle 2b

| Stunden nach<br>Thio-NA-Applikation | Leber                             |                                    | Gehirn                            |                                    |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
|                                     | Prozente<br>Thio-NAD <sup>+</sup> | Prozente<br>Thio-NADP <sup>+</sup> | Prozente<br>Thio-NAD <sup>+</sup> | Prozente<br>Thio-NADP <sup>+</sup> |
| 4 h                                 | 6,2 - 6,9                         | 9,5                                | 6,5 - 7,2                         |                                    |
| 5 1/2                               | -                                 | 2,43 - 5,5                         | 8,7 - 9,3                         | 14,5 - 21,5                        |
| 9 3/4                               | 9,3 - 10,76                       | 10,4 - 12,1                        | 11,3 - 11,6                       | 50 - 57,9                          |
| 17 h                                | 5,9 - 13,9                        | 8,0 - 17,6                         | 12,8 - 16,7                       | 25,8 - 28,6                        |
| 20 h                                | 9,5 - 15,0                        | 9,3 - 14                           | 15,3 - 17,1                       | 31                                 |
| 24 h                                | 5,2 - 8,4                         | 7,8 - 11,3                         | 11                                | 27,3                               |

Tabelle 3

Gehalt an  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  und  $\text{NADPH}$  (in  $\text{nMol/g}$  Feuchtgewicht) in Leber und Gehirn von unbehandelten Ratten (Kontrollen)

|                | $\text{NAD}^+$ | $\text{NADP}^+$ | $\text{NADH}$ | $\text{NADPH}$ |
|----------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|
| Rattenleber :  | $610 \pm 73$   | $40 \pm 6$      | $167 \pm 13$  | $303 \pm 21$   |
| Rattengehirn : | $319 \pm 14$   | $13 \pm 3$      | $67 \pm 12$   | $25 \pm 8$     |

Gehalt an  $\text{NADH}$  und  $\text{NADPH}$  (in  $\text{nMol/g}$  Feuchtgewicht) in Leber und Gehirn von Ratten (  $n = 4$  ), die mit  $250 \text{ mg/kg}$  Nicotinsäurethioamid (Thio-NA) vorbehandelt wurden.

| Stunden nach<br>Thio-NA-<br>Applikation | Leber         |                | Gehirn        |                |
|-----------------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
|                                         | $\text{NADH}$ | $\text{NADPH}$ | $\text{NADH}$ | $\text{NADPH}$ |
| 4                                       | $127 \pm 19$  | $291 \pm 7$    | $39 \pm 7$    | $24 \pm 3$     |

Als Erklärung des prozentual viel höheren Thio-NADP<sup>+</sup>-Anteils im Rattengehirn könnte die stärkere Transferase-Aktivität der Gehirnmikrosomen herangezogen werden.

Tabelle 4

Abbau-Rate von Thio-NAD<sup>+</sup> und Thio-NADP<sup>+</sup> durch Rattengehirn-mikrosomen:

---

|                               |   |                       |
|-------------------------------|---|-----------------------|
| NADP <sup>+</sup> -Abbau      | = | 2.00 $\mu$ Mol/mg N/h |
| Thio-NADP <sup>+</sup> -Abbau | = | 2.08 $\mu$ Mol/mg N/h |
| NAD <sup>+</sup> -Abbau       | = | 8.60 $\mu$ Mol/mg N/h |
|                               |   | 9.0 $\mu$ Mol/mg N/h  |
| Thio-NAD <sup>+</sup> -Abbau  | = | 8.40 $\mu$ Mol/mg N/h |

---

Interessanterweise werden auch die NADP<sup>+</sup>-Analoge des 3-Acetylpyridines und 6-Aminonicotinamids mit etwa der gleichen Geschwindigkeit gespalten wie das natürliche Coenzym. Dagegen sind das 6-ANAD<sup>+</sup> und das 3-AcPyAD<sup>+</sup> gegenüber der enzymatischen Hydrolyse wesentlich stabiler als NAD<sup>+</sup>. (22)

Der Gehalt an NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> in der Leber und im Gehirn wird durch Thio-NA nur geringfügig beeinflusst. Bei einer Dosis von 250 mg/kg wird bis zu 24 Stunden nach Applikation die NAD(P)<sup>+</sup>-Konzentration maximal um etwa 20 % vermindert. Beim Gesamt-NAD<sup>+</sup>-Gehalt (NAD + Thio-NAD) des Gehirns ist nach 17 - 24 h eine Verminderung um etwa 10 % zu verzeichnen. Eine Abnahme in der gleichen Größenordnung, nämlich um 10 - 15 % wurde auch nach 6-AN-(100 mg/kg)-Gabe gefunden. (22)

Bei den reduzierten Pyridinnucleotiden konnte nach einer einmaligen Gabe von Thio-NA eine starke Erniedrigung der NADH-Werte im Rattengehirn und -leber registriert werden, während die entsprechenden NADPH-Werte mit denen der Kontrolltiere identisch waren. (vgl. Tab. 3)

Ob nun ein entsprechend hoher Anteil an Thio-NADH in den Organen gebildet wurde, konnte nicht geklärt werden, da Thio-NAD(P)H bei der verwendeten Aufarbeitung (s. Methoden) des Gewebes zerstört wird.

Werden 500 mg/kg Thionicotinamid, also die doppelte Dosis wie bei den vorher beschriebenen Versuchen, verabreicht, so führt dies nicht zu einer Steigerung des Thio-NAD(P)<sup>+</sup>-Anteils in den Organen. Die prozentualen Mengen an gebildeten Analogen liegen in ähnlicher Größenordnung wie nach 250 mg/kg.

### 3. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des 6-Aminonicotinsäureamids (6-AN)

---

Wird in 6-Stellung des Nicotinamid-Moleküls eine Amino-Gruppe eingeführt, entsteht ein im Vergleich zum Thio-NA oder auch 3-AP sehr toxischer Antimetabolit des Nicotinamids mit einem breit gefächerten Vergiftungsbild. (22, 37, 49 - 54)

Nach Zufuhr von insgesamt 5 - 10 mg/kg 6-AN treten beim Menschen und bei der Ratte neurologische Schäden auf, unabhängig davon, ob diese Menge in einmaligen oder täglichen, geringeren Dosen (1 mg/kg) verabreicht wird. (54)

Die Metabolisierung des 6-AN ist nicht geklärt. Nach Applikation von 7-<sup>14</sup>C-6-Aminonicotinamid konnte bisher im Urin lediglich die unveränderte Substanz sicher identifiziert werden.

3 weibliche Ratten erhielten insgesamt 62  $\mu$ Ci 6-AN verabreicht. Im 24h-Urin wurden davon 55,8  $\mu$ Ci wiedergefunden. Der Urin wurde gefriergetrocknet und der viskose Rückstand mit abs.

Äthanol (77 ml) gerührt. In der äthanolischen Phase fanden sich insgesamt 24,4  $\mu$ Ci nach einmaliger Extraktion. Der äthanolische Extrakt wurde dünnschichtchromatographisch im folgenden Fließmittelsystem getrennt:

Benzol / Methyläthylketon (bzw. Aceton) / Methanol / konz.  $\text{NH}_3$  (40 : 40 : 10 : 4). Als Referenzsubstanzen wurden 6-AN, 6-Aminonicotinsäure und 6-AN-Methojodid aufgetragen.

Es konnten zwei intensive Peaks und ein wenig intensiver Peak (Abb. 2) ( $R_F = 0.44$ ) festgestellt werden. Der Peak mit dem  $R_F = 0.238$  ist mit 6-AN identisch, wie auch das UV-Spektrum ergab. Der Peak an der Startlinie wurde im System Methanol/Wasser (1 : 1) rechromatographiert, dabei traten zwei Gipfel zum Vorschein. Wahrscheinlich liegt hier keine einheitliche Substanz vor, zumal das UV-Spektrum nicht mit demjenigen von 6-Aminonicotinsäure-Methojodid identisch war.

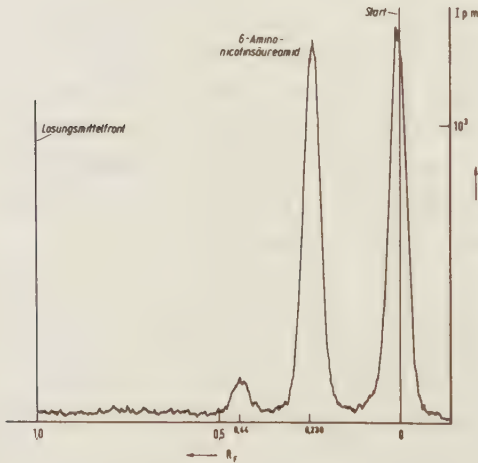


Abb. 2: Radiochromatogramm von Rattenurin nach 6-Aminonicotinamid ( $^{14}\text{C}$ )-Gabe

#### 4. NAD(P)<sup>+</sup>-Analoge des 6-Aminonicotinamids

6-AN wird in vitro und in vivo gut auf NAD(P)<sup>+</sup> transferiert. (22, 37, 51)  
Bei Ratten werden die absolut höchsten Konzentrationen der 6-AN-Analogen in Niere, Leber, Lungen und Gehirn gefunden, wobei relativ weit mehr 6-ANADP<sup>+</sup> als 6-ANAD<sup>+</sup> gebildet wird. (22, 52)  
Kaplan berichtet 1961, daß das 6-ANAD<sup>+</sup> chemisch durch (19) Dithionit nicht reduziert werden kann. Auch die Modell-Substanz, das 6-Aminonicotinamid-Methojodid ist weder durch Dithionit noch durch NaBH<sub>4</sub> hydrierbar. (vgl. S. 63)

#### 5. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des 6-Aminonicotinsäurethioamids (6-ATN)

Wie schon erwähnt, hat der Ersatz des Sauerstoffs in der Carbonamid-Gruppe des Nicotinamids durch Schwefel keinen Einfluß auf die Toxizität. Die Einführung einer Amino-Gruppe in 6-Stellung des Pyridinrings erzeugt ein äußerst toxisches Nicotinamid-Analoges. Es war nun von großem Interesse zu sehen, inwieweit der Ersatz des Sauerstoffs im 6-AN durch Schwefel dessen Eigenschaften beeinflusst.

Ganz im Gegensatz zum 6-AN, das schon bei einer einmaligen Dosis von ca. 5 mg/kg bei Ratten zu neurotoxischen Symptomen und nach 20 mg/kg zum Tode der Tiere führt, zeigen die Tiere bei einer einmaligen Gabe von 100 mg/kg 6-ATN per os keinerlei Störungen in ihrem Verhalten. Lediglich die Körpertemperatur war 8 h nach Verabreichung um 1,17°C ( $p < 0,01$ ,  $n = 9$  Tiere) erniedrigt. Selbst eine einmalige Gabe von 250 mg/kg per os überlebten die Versuchstiere ( $n = 9$ ). Unter diesen Bedingungen traten ausgeprägte - jedoch reversible - Effekte auf. Es kommt zu einem erheblichen Gewichtsverlust, der bis zu 35 % des

ursprünglichen Körpergewichtes betragen hat. Ein Tier hatte erst am 22. Tag nach einer einmaligen Gabe sein ursprüngliches Körpergewicht wiedererlangt.

24 h nach Gabe des 6-ATN (250 mg/kg) war nicht nur die Körpertemperatur signifikant um  $1,98^{\circ}\text{C}$  gesunken ( $p < 0,01$ ,  $n = 9$ ), die Tiere zeigten auch eine erhebliche Verlangsamung ihrer Bewegungen. Die hinteren Extremitäten waren stark gespreizt. Bei drei Tieren war die Bewegungsfähigkeit der hinteren Extremitäten sieben Tage lang bis zur völligen Lähmung beeinträchtigt. Mehrere Tiere zeigten Durchfallerscheinungen.

Die Metabolisierung des 6-ATN konnte nicht vollständig geklärt werden. Nach Verabreichung von 100 mg/kg 6-ATN i. p. an weiblichen Ratten wurde der 32 h-Urin gesammelt, gefriertrocknet und der viskose Rückstand bei  $30 - 40^{\circ}\text{C}$  mit abs. Äthanol extrahiert. Der äthanolische Extrakt wurde dünnschichtchromatographisch in drei Fließmittelsystemen aufgetrennt. Es konnten vier Bestandteile durch Vergleich der UV-Spektren mit Referenzsubstanzen identifiziert werden: 6-Amino-thionicotinamid-S-oxid, 6-Aminothionicotinamid, 6-Aminonicotinamid und 6-Amino-3-cyanopyridin. Ob es sich bei den beiden letzteren um echte Metaboliten handelt oder um Artefakte, die bei der Aufarbeitung des Urins entstanden sein könnten, muß noch geklärt werden. Vielleicht beruhen aber die beschriebenen pharmakologischen Effekte auf einer partiellen Umwandlung des 6-ATN in 6-AN.

#### 6. $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge und Modellsubstanzen des 6-Aminonicotinsäurethioamids

---

Trotz aller Bemühungen ist es nicht gelungen, in vitro ein  $\text{NADP}^+$ -Analoges des 6-ATN zu synthetisieren. Da somit keine Vergleichssubstanz zur Verfügung stand, wurde eine eventuelle in vivo-Transferierung auf  $\text{NAD(P)}^+$  nicht untersucht.

Es ist jedoch gelungen, das 6-Amino-thionicotinamid-Methojodid als Modellsubstanz zu erhalten. Dieses Coenzym-Modell ist - erwartungsgemäß - chemisch weder mit Dithionit noch mit  $\text{NaBH}_4$  hydrierbar. Dieses Verhalten gegenüber nucleophiler Addition kann durch den induktiven Effekt der Amino-Gruppe in 6-Stellung erklärt werden, wie bereits beim 6-Amino-nicotinsäureamid ausgeführt wurde. (vgl. S. 63)

#### 7. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des Nicotinsäureselenoamides (Seleno-NA)

Nachdem sich gezeigt hatte, daß das Thionicotinamid nur unwesentlich toxischer ist als das Nicotinamid, war es überraschend, daß das Selenonicotinamid ein äußerst toxisches Nicotinamid-Analoges darstellt.

Die absolut tödliche Dosis liegt bei der Ratte knapp unter 10 mg/kg (bei i. p. Injektion). Die vergifteten Tiere zeigen charakteristische Symptome. Die Todesursache scheint in einem Herzversagen zu liegen. Bei histologischen Untersuchungen wurden nur am Myokard als einzigem Organ Schädigungen gefunden (55). Jedenfalls gibt es keine Hinweise auf eine Vergiftung des Zentralnervensystems. Ganz im Gegensatz zu den Befunden bei der 3-Acetylpyridin- und 6-AN-Vergiftung können die schweren toxischen Effekte des Selenonicotinamids durch Vorbehandlung mit Nicotinamid (250 mg/kg 1 bzw. 2 Stunden vor Injektion des Selenonicotinamides) nicht verhindert werden. (32, 56, 57)

Die toxischen Eigenschaften des Selenonicotinamids beruhen auch nicht auf einer unspezifischen Selenvergiftung, wie Versuche mit Selenharnstoff es wahrscheinlich gemacht haben. Es besteht in der Dosis-Wirkungs-Beziehung ein großer Unterschied, ob die Substanz per os oder intraperitoneal verabreicht wird.

Verabreichung per os (in 1.2-Propylenglykol)

- a) Eine einmalige Gabe von 10 mg/kg wird von den Tieren (160 - 190 g) ohne weiteres vertragen. Lediglich das Körpergewicht nimmt etwas ab, nach einer Woche hatte noch kein Tier (n = 6) sein ursprüngliches Körpergewicht wiedererlangt.
- b) Eine akute Dosis von 25 mg/kg überlebten 75 % der Tiere. Die Ratten sind sediert, verlieren an Gewicht und zeigen eine Erniedrigung der Körpertemperatur (Maximum ca. 32 h nach Verabreichung).
- c) Bei einer einmaligen Gabe von 100 mg/kg per os starben alle Versuchstiere (n = 5). 17 h nach Infusion des Selenonicotinamids waren 4 von 5 Tieren gestorben. Das zu diesem Zeitpunkt noch lebende Tier zeigte eine außerordentlich erniedrigte Körpertemperatur (von 38,1° vor Infusion auf 32,4° 17h danach).

Bei der intraperitonealen Verabreichung in 0.9 %iger NaCl-Lösung sind die toxischen Dosen wesentlich niedriger.

Eine einmalige Gabe von 9,74 mg/kg Selenonicotinamid i.p. ist absolut tödlich. Die Tiere sterben 7 - 10 Stunden nach Injektion. Tiere im chronischen Versuch, die mehrere Tage lang mit subletalen Dosen an Selenonicotinamid (1,7 - 5,35 mg/kg) vorbehandelt wurden, überleben eine Gabe von 9,74 mg/kg etwas länger (mindestens 24 h) als nicht vorbehandelte Tiere.

Erhalten die Tiere akut eine Dosis von 17,7 mg/kg i.p., so tritt der Tod schon nach 3 Stunden ein. Schon 5 Minuten nach Injektion zeigen die Tiere Schnappatmung, und es tritt Schleim aus der Nase aus. Im weiteren Verlauf der Vergiftung zeigen die Tiere starke Schnappatmung und Flankenatmung, sie bewegen sich kaum noch, reagieren kaum auf Anfassen.

Der Sektionsbefund:

- Leber : blaurot, gestaut, straff gespannte, glatte,  
glänzende Oberfläche  
kein Ascites
- Thorax : in der Pleurahöhle fanden sich ca. 1 1/2  
bis 2 ml eines klaren pleuralen Ergusses.

Toxikologie des Selenharnstoffes

Zum Vergleich mit Selenonicotinamid wurde eine Substanz gesucht, die ähnliche chemische Struktur hat. Der Selenharnstoff enthält ebenfalls die Gruppe  $\begin{array}{c} \text{-C-NH}_2 \\ \parallel \\ \text{Se} \end{array}$ .

Selenharnstoff enthält 64,1 % Selen pro Mol, Selenonicotinamid dagegen nur 42,66 % pro Mol.

Eine einmalige Dosis von 12 mg/kg intraperitoneal überlebten alle Tiere. Dies entspricht rechnerisch einer Selenmenge von 7,69 mg/kg. Beim Selenonicotinamid ist eine Dosis von 10 mg/kg  $\hat{=}$  4,27 mg Selen/kg absolut tödlich.

Nach einer akuten Dosis von 38,5 mg/kg Selenharnstoff sterben die Tiere am dritten Tag. Das Vergiftungsbild ist ganz anders als beim Selenonicotinamid.

Es ist wahrscheinlich, daß die toxischen Eigenschaften des Selenonicotinamids nicht auf einer unspezifischen Selenvergiftung beruhen, sondern spezifisch für das Molekül des Nicotinamid-Analogen sind.

## 8. $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge und Coenzym-Modellsubstanzen des Selenonicotinamids

---

Selenonicotinamid wird *in vitro* mit Hilfe der  $\text{NAD(P)}^+$ -Glykohydrolase (EC 3.2.2.6) aus Rattenmilzmikrosomen sehr gut auf  $\text{NADP}^+$  transferiert (58). Weder die  $\text{NAD(P)}$ -Glykohydrolase aus Rattenmilz noch die  $\text{NAD}$ -Glykohydrolase aus Schweinehirn und Kalbsmilz hatten jedoch die Fähigkeit, im  $\text{NAD}^+$ -Molekül Nicotinamid gegen Selenonicotinamid auszutauschen. Auch der Versuch, mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus dem mit guter Ausbeute herstellbaren Seleno- $\text{NADP}^+$  ein Seleno- $\text{NAD}^+$  zu gewinnen, war ohne Erfolg geblieben (59).

In Analogie zu den Befunden nach der Verabreichung von Thio-Nicotinamid hätte die *in vivo*-Synthese von Seleno- $\text{NADP}^+$ -Analogen möglich sein können. Es ist jedoch nicht gelungen, die *in vivo*-Bildung eines Seleno- $\text{NADP}^+$  nachzuweisen.

## 9. Citrat-Gehalt in Gehirn und Leber nach Selenonicotinamid- gaben

---

Aus den später beschriebenen enzymkinetischen Untersuchungen (vgl. S. 40) geht hervor, daß die Isocitrat-Dehydrogenase *in vitro* durch freies Selenonicotinamid gehemmt wird. Daher lag es nahe abzuklären, ob die toxischen Eigenschaften des Selenonicotinamids zum Teil auf einer *in vivo*-Hemmung der Isocitrat-Dehydrogenase beruhen. Wenn dies zutreffen würde, so müßte in den Organen ein signifikanter Anstieg an Citrat nachweisbar sein, wie er z. B. bei der Vergiftung mit Fluoressigsäure bzw. Fluorcitronensäure beobachtet wird (60), denn bei dem folgenden Teilschritt des Citronensäurecyclus



liegen im Gleichgewicht ca. 91 % Citrat, 3 % *cis*-Aconitat und 6 % Isocitrat vor. (61)

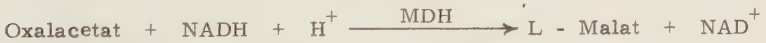
Nur bei genügender Aktivität der Isocitrat-DH wird das gesamte Isocitrat nach folgender Gleichung in  $\alpha$ -Ketoglutarat übergeführt:



Zur Bestimmung des Citrat-Gehaltes in verschiedenen Organen sollte die Gesamtbilanzgleichung der beiden aufgeführten Teilschritte herangezogen werden. Dazu wurde Aconitase aus Schweineherz-Kammermuskulatur isoliert ( 61)

Das so gewonnene Fermentpräparat zeigte eine hohe Aktivität gegenüber reinen Citrat-Lösungen, wurde jedoch durch die Gewebeextrakte gehemmt. Dies könnte auf einer zu hohen  $\text{K}^+$ -Konzentration der Extrakte beruhen, da immer mit KOH neutralisiert wurde. (vgl. 64, p. 450)

Deshalb erwies es sich als günstig, die durch Citrat-Lyase (62,63) (EC 4.1.3.6) aus *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella aerogenes*) katalysierte Reaktion zur Bestimmung des Citrates zu verwenden.



Bei den enzymatischen Umsetzungen, die zur Bestimmung des gebildeten Oxalacetats (mittels Malat-DH) und des Pyruvats (mittels Lactat-DH) herangezogen werden, liegt das Gleichgewicht bei pH 7.6 ganz auf der rechten Seite.

Nach Verabreichung verschiedener Dosen an Selenonicotinamid (von 3 mg/kg bis zu 16 mg/kg) konnte keine relevante Veränderung des Citrat-Gehaltes in Gehirn, Leber und Herz festgestellt werden, wie die folgende Tabelle zeigt:

Tabelle 5

Citrat-Gehalt in verschiedenen Organen nach Selenonicotinamid-Gaben in  $10^{-7}$  Mol pro g Feuchtgewicht

| Selenonicotinamid                          | Gehirn      |             | Leber       |             | Herz                        |           |
|--------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-----------|
|                                            | Kontr.      | Behandelt   | Kontr.      | Behandelt   | Kontr.                      | Behandelt |
|                                            |             |             |             |             | (Mittelwerte aus 2 Organen) |           |
| 3 mg/kg<br>(Tiere nach 24 h getötet)       | 3,22 ± 0,01 | 3,2 ± 0,01  | 3,03 ± 0,85 | 3,45 ± 1,51 | 4,01                        | 3,76      |
| 5 mg/kg<br>(Tiere nach 6 1/2 h getötet)    | 3,45 ± 0,12 | 2,96 ± 0,16 | 2,78        | 4,49 ± 0,07 | 3,04                        | 4,65      |
| 12,7 mg/kg<br>(Tiere nach 4 1/2 h getötet) | -           | 2,77 ± 0,78 | -           | 4,34 ± 0,46 | 2,3                         | 3,62      |
| 16,95 mg/kg<br>(Tiere nach 3 h getötet)    | 2,49        | 3,03 ± 0,08 | 2,9         | 2,95 ± 0,08 | 4,08                        | 3,84      |

Diese Werte stimmen gut mit Angaben in der Literatur überein.  
Williamson und Corkey (64) finden folgende Citrat-Werte:

Citrat-Gehalt in:

Gehirn  $1470 \times 10^{-9}$  M/g Trockengew.  $\hat{=} 3,67 \times 10^{-7}$  M/g  
Feuchtgew.

Leber  $900 \times 10^{-9}$  M/g Trockengew.  $\hat{=} 2,25 \times 10^{-7}$  M/g  
Feuchtgew.

10. Zusammenfassung der Toxizität, Coenzym-Analogenbildung  
und Verstoffwechselung einiger Antimetaboliten des Nicotinamids

Tabelle 6

Vergleich der Toxizität bei der Ratte

| Substanz                | DL <sub>50</sub> oral | DL <sub>100</sub> i. p. |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Nicotinamid             | ca. 4,5 g/kg          |                         |
| Thionicotinamid         | ca. 1 g/kg            |                         |
| 6-Aminonicotinamid      |                       | 20 mg/kg                |
| 6-Amino-thionicotinamid | > 250 mg/kg ,         |                         |
| Selenonicotinamid       | > 25 mg/kg            | 10 mg/kg                |

Wird in der Carbonamid-Gruppe des Nicotinamids der Sauerstoff durch Schwefel ersetzt, so wird dadurch die Toxizität nicht erhöht. Wird jedoch in 6-Stellung des Pyridin-Kerns eine Amino-Gruppe eingeführt, so erhält man einen der toxischsten Antimetaboliten des Nicotinamids. Überraschend war nun der Befund, daß der Ersatz des Sauerstoffs im 6-Aminonicotinamid durch Schwefel die Toxizität stark vermindert. Der Ersatz des Schwefels im Thionicotinamid durch Selen ergibt eine sehr toxische Verbindung, deren Vergiftungsbild von demjenigen des 6-Aminonicotinamids ganz verschieden ist, da keine neurotoxischen Symptome beobachtet werden konnten.

#### Analogenbildung in vitro und in vivo:

Wie Nicotinamid wird auch das entsprechende Thioamid in vitro und vivo durch die NAD(P)-Glycohydrolase sehr gut auf  $\text{NAD(P)}^+$  transferiert.

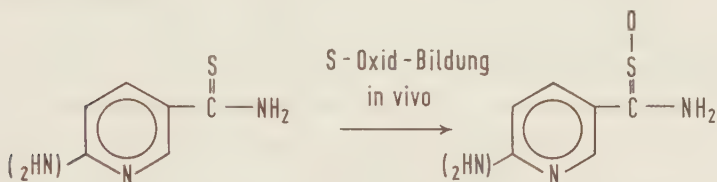
Während das 6-Aminonicotinamid nicht nur in vitro fermentativ unphysiologische Coenzym-Analoga zu bilden vermag, sondern auch in die Zellen eindringt, so daß es in den verschiedenen Organen zur Synthese abnorm strukturierter Pyridinnucleotide kommt, konnte überraschenderweise beim 6-Amino-thionicotinamid keine Transferierung auf  $\text{NAD(P)}^+$  nachgewiesen werden.

Wie in der vorliegenden Arbeit ausgeführt wurde, gelang nur im  $\text{NADP}^+$  der Austausch von Nicotinamid gegen Selenonicotinamid. Für eine enzymatische Bildung eines Selenonicotinamid- $\text{AD(P)}^+$  in vivo gibt es bisher keinen Hinweis.

### Verstoffwechselung:

Mit Ausnahme des Nicotinamids ist von keinem der in der obigen Tabelle aufgeführten Metaboliten die Verstoffwechselung geklärt. Auch vom Nicotinamid, dessen fundamentale Bedeutung für den lebenden Organismus seit 1936 bekannt ist, wurden die letzten beiden Stoffwechselprodukte, (6-Hydroxynicotinamid und 6-Hydroxynicotinsäure) erst 1969 beschrieben. (26)

Auffallend ist, daß beide Antimetaboliten mit Carbonsäurethioamid-Gruppe bei der Ratte in vivo in S-oxide umgewandelt werden können.



Vom Selenonicotinamid gelang es nicht, ein Stoffwechselprodukt zu identifizieren. Ein Trimethylselenonium-Ion, das 1970 von Palmer et al. als Urin-Ausscheidungsprodukt nach Verstoffwechselung verschiedener selenhaltiger Aminosäuren bei der Ratte entdeckt wurde, konnte mit den von diesen Autoren beschriebenen papierchromatographischen Methoden nicht nachgewiesen werden. (65)

Die enzymatische Methylierung am Ring-Stickstoff, die für das Nicotinamid einen bei verschiedenen Säugetieren verbreiteten Stoffwechselweg darstellt, ist zumindest beim 6-Aminonicotinamid wahrscheinlich.

Allen erwähnten Antimetaboliten - mit Ausnahme des Selenonicotinamid - ist gemeinsam, daß bei der Ratte nach oraler oder intraperitonealer Applikation eine Teilmenge im Urin wieder unverändert ausgeschieden wird.

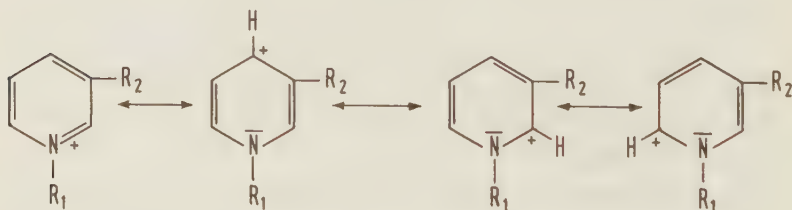
## Kapitel II

### NAD<sup>+</sup>- und NADP<sup>+</sup>-Analoge

Die überragende Bedeutung des Nicotinamids besteht in seiner Funktion als Wasserstoffcarrier in den Coenzymen NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup>. Bisher sind mehr als hundert vom chemischen Standpunkt aus als verschiedenartig zu bezeichnende Reaktionen bekannt, die durch pyridinnucleotidabhängige Dehydrogenasen katalysiert werden. (21, 66, 67)

Bei pyridinnucleotidabhängigen Dehydrogenasen wechselt in vielen Fällen (vgl. Kapitel "Kinetik", S.128) in einem ternären Enzym-Coenzym-Substrat-Komplex das Hydrid-Ion (H<sup>-</sup>) direkt vom Substrat oder über Flavine auf das Pyridinnucleotid (bzw. vom Dihydropyridinnucleotid auf das Substrat) über. (21, 66, 67)

Die reversible Addition eines Hydrid-Ions an das Pyridin-Salz ist mit den mesomeren Formen des Pyridiniumkations - die für nucleophile Additionen empfänglich sind - zu erklären, wobei die chemische Natur des Substituenten R<sub>2</sub> von erheblicher Bedeutung ist (induktiver Effekt).



Bisher lag das Gewicht der Forschung über Pyridinnucleotid-analoge vorwiegend auf dem NAD<sup>+</sup>. NADP<sup>+</sup>-Verbindungen sind kaum untersucht. Einer der Gründe, weshalb bisher NADP<sup>+</sup>-Analoge gegenüber den NAD<sup>+</sup>-Analogen vernachlässigt wurden,

ist sicher die Annahme, daß sich zu jedem synthetisierten  $\text{NAD}^+$ -Analogen ohne große Schwierigkeiten die entsprechende  $\text{NADP}^+$ -Verbindung gewinnen läßt und umgekehrt. Daß dies nicht notwendigerweise so sein muß, zeigte sich beim Austausch von Nicotinamid in  $\text{NAD(P)}^+$  durch Selenonicotinamid (58, 59) und 5-Fluor-nicotinamid. Während es Kaplan und Mitarbeitern nicht gelang, ein entsprechendes  $\text{NAD}^+$ -Analoges herzustellen (19), gelang es Schabarek und Coper, das 5-Fluor-nicotinamid- $\text{ADP}^+$  zu synthetisieren (68a, 68b).

N.O. Kaplan und Mitarbeiter befaßten sich vorwiegend mit  $\text{NAD}^+$ -Analoga, die im Pyridinteil des Moleküls variierten (18, 19, 21), während Pfeleiderer et al. im Purinteil des Moleküls veränderte Nucleotide auf ihre Eigenschaft als Wasserstoff-carrier prüften (71a - 71 d). Einige Experimente wurden auch mit Verbindungen durchgeführt, bei denen die Ribose im  $\text{NAD}^+$  durch Desoxyribose (Fawcett, 69), Didesoxyribose (Woenckhaus, 70a) oder Glucose (Woenckhaus, 70b) ersetzt war.  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoga, die an Stelle des Pyridins andere N-heterocyclische Systeme enthalten, wurden von Alivisatos u. a. (Imidazole z. B. Histamin, Histidin, Benzimidazol; 72 - 75) sowie Schabarek, Coper (Chinoline und Nicotin; 68a) und Ciotti (38) (Thiadiazole) auf enzymatischem Wege hergestellt.

Schließlich wurden auch Änderungen im Pyrophosphat-Teil vorgenommen (Monomethyl- und Dimethylester) (Pfeleiderer, 1960, 76) oder ein drittes Phosphat eingeführt (Kaplan, 1962, 69), so daß eine Verbindung Nicotinamid-Ribose-Phosphat-Phosphat-Phosphat-Ribose-Adenin entstand, mit einer Struktur, wie sie früher für das  $\text{NADP}^+$ -Molekül angenommen wurde (vgl. H. Brederick in "Physiologische Chemie," Band I, S. 833, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1951. Herausgeber: B. Flaschenträger und E. Lehnarz).

Von den wenigen  $\text{NADP}^+$ -Analogen, die bisher untersucht wurden, ist das in 3'-Stellung der Ribose veresterte  $\text{NADP}^+$  (77) besonders interessant. In saurer Lösung kann die Phosphorsäure-monoester-

Gruppe von der 2'-Position in die 3'-Position wandern.

Das 3'-Isomere des  $\text{NADP}^+$  ist inaktiv in Reaktionen, die durch  $\text{NADP}^+$ -spezifische Enzyme katalysiert werden; es kann jedoch als Wasserstoffionenacceptor bei Enzymen fungieren, die sowohl  $\text{NADP}^+$  als auch  $\text{NAD}^+$  akzeptieren. (77)

Demzufolge scheint die Phosphorsäure-monoester-Gruppe wesentlich für die Aktivität in  $\text{NADP}^+$ -spezifischen Enzymen zu sein (Shuster and N. O. Kaplan, 1955).

In allerjüngster Zeit beschrieben M. Kuwahara und Mitarbeiter (1969, 1970) ein Phosphokinase-System aus *Proteus mirabilis*, das in die 2' (oder 3'-)Position am Nicotinamid-Ribose-Rest des  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  eine Phosphat-Gruppe einführt, wodurch bisher unbekannte  $\text{NAD(P)}$ -Analoge gebildet werden, die an der Ribose des Nicotinamids phosphoryliert sind. (78 - 80)

Die normalerweise nicht vorkommenden Coenzym-Analogen (21, 22) können in den meisten Fällen die Funktion eines Wasserstoff-carriers nicht voll erfüllen. Allerdings geht aus den Untersuchungen von Kaplan und Mitarbeitern hervor, daß Thio- $\text{NAD}^+$  kein wesentlich schlechterer Wasserstoffüberträger ist als  $\text{NAD}^+$ . (81) Von ihnen wurde sogar gezeigt, daß Thio- $\text{NAD}^+$  und 3-AcPyrAD<sup>+</sup> (81, 107) in der durch die Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber katalysierten Reaktion eine gegenüber  $\text{NAD}^+$  um das 3- 4fache gesteigerte Aktivität aufweisen (Anderson, Kaplan, 1959). Aufgrund der Erfahrungen von Herken, Coper, Neubert und Brunnemann (82-85) mit 3-AcPyrADP<sup>+</sup> und 6-ANADP<sup>+</sup> wurde in dieser Arbeit das Hauptgewicht auf die  $\text{NADP}^+$ -bedürftigen Umsetzungen gerichtet.

In kinetischen Untersuchungen wurde geprüft, inwieweit Thio- $\text{NADP}^+$  und Seleno- $\text{NADP}^+$  bei folgenden  $\text{NADP}^+$ -spezifischen Oxidoreduktasen als Cofaktor wirksam ist: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus Hefe und aus Rattenhirn), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (aus Hefe), Isocitrat-Dehydrogenase (aus Herzmuskel und aus Rattenhirn), Glutathion-Reduktase (aus Hefe) und malic enzyme (aus Rattenhirn).

Vergleich von Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup> in cytoplasmatischen NADP<sup>+</sup>-abhängigen Oxidoreduktasen

Thio-NADP<sup>+</sup> reagierte mit allen untersuchten Dehydrogenasen - wenn auch meist langsamer als das natürliche Coenzym. Die Ergebnisse, die mit den kristallisierten, käuflich erworbenen Enzymen erhalten wurden, konnten durch die Untersuchungen mit den ungereinigten Cytoplasmatischen Enzymen aus Rattenhirn qualitativ bestätigt werden.

Tabelle 7

| Enzyme                           | Herkunft                   | Relative, reziproke Aktivität von Thio-NADP, bez. auf NADP = 1 |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase | Hefe<br>Rattenhirn         | 3, 6<br>3                                                      |
| 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase | Hefe                       | 22                                                             |
| Isocitrat-Dehydrogenase          | Schweineherz<br>Rattenhirn | 60<br>10 - 11.3                                                |
| malic enzyme                     | Rattenhirn                 | 4.5                                                            |
| Glutathionreduktase              | Hefe<br>Rattenhirn         | 19<br>2.8                                                      |

Bei den Enzymen aus Säugetierorganen war lediglich die Aktivität des Thio-NADP<sup>+</sup> in der durch die Isocitrat-DH katalysierten Reaktion stärker vermindert. Da nur bei diesem Ferment ein

zusätzlicher Hemmeffekt zu erwarten war, wurden mit der Isocitrat-DH Kombinationsversuche angestellt. Dabei stellte sich heraus, daß selbst bei einem Verhältnis von  $\text{NADP}^+$  zu Thio- $\text{NADP}^+$  von 1 : 1 bei einer Konzentration von  $1.8 \cdot 10^{-4}$  molar die Aktivität der Isocitrat-DH nur um 20 % verringert war.

Da wie erwähnt nach Verabreichung von 250 mg/kg Thio-nicotinamid die  $\text{NAD}^+$ - und  $\text{NADP}^+$ -Konzentration nicht wesentlich durch die Bildung der Analogen abnimmt, Thio-NAD(P) hydrierbar ist und mit Ausnahme der Isocitrat-Dehydrogenase der Wasserstoff mit nur unwesentlich geringerer Geschwindigkeit übertragen wird, ist erklärlich, daß Thio-nicotinamid zu keinen grob pharmakologischen Ausfallerscheinungen führt, obwohl in den Zellen physiologisch nicht vorkommende Thionicotinamid-Nucleotide gebildet werden.

Analog zu den Untersuchungen beim Thio- $\text{NADP}^+$  wurde geprüft, inwieweit Seleno- $\text{NADP}^+$  bei den oben erwähnten  $\text{NADP}^+$ -spezifischen Oxidoreduktasen noch als Cofaktor wirksam ist. Während Thio- $\text{NADP}^+$  mit allen untersuchten Dehydrogenasen - wenn auch meist langsamer als das natürliche Coenzym - reagiert, wird Seleno- $\text{NADP}^+$  nur von der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Hefe und Rattenhirn) mit der gleichen Geschwindigkeit wie  $\text{NADP}^+$  reduziert.

Tabelle 8

| Enzym                            | Herkunft     | Relative, reziproke Aktivität von Seleno-NADP(H) |
|----------------------------------|--------------|--------------------------------------------------|
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase | Hefe         | 1                                                |
|                                  | Rattenhirn   | 1                                                |
| 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase | Hefe         | 120                                              |
|                                  | Rattenhirn   | $\infty$                                         |
| Isocitrat-Dehydrogenase          | Schweineherz | $\infty$                                         |
|                                  | Rattenhirn   | $\infty$                                         |
| Glutathion-Reduktase             | Hefe         | 50                                               |
|                                  | Rattenhirn   | $\infty$                                         |

$\infty$  = enzymatische Reduktion war nicht meßbar.

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Rattenhirn (1.1.1.49)  
(D-Glucose-6-phosphate NADP oxidoreductase from rat brain)

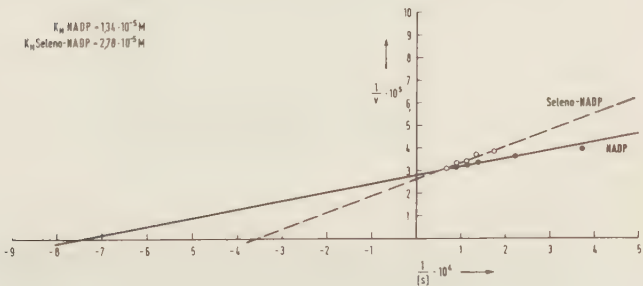


Abb. 3: Coenzym-Aktivität von Seleno-NADP<sup>+</sup> im Vergleich mit NADP<sup>+</sup> gegenüber der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Rattenhirn

6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase aus Rattenhirn (EC 1.1.1.44)  
(6-Phospho-D-gluconate:NADP oxidoreductase, from rat brain)

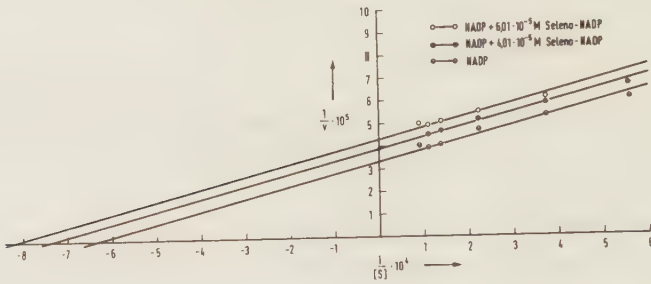


Abb. 4a: Unkompetitive Hemmung der 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase-Reaktion (Rattenhirn) durch Seleno-NADP<sup>+</sup>

6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase aus Rattenhirn (EC 1.1.1.44)  
(6-Phospho-D-gluconate:NADP oxidoreductase, from rat brain)

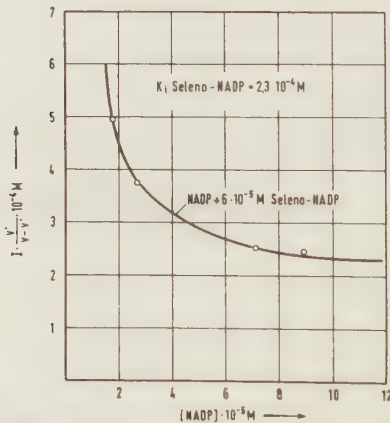


Abb. 4b: Hemmung der 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase (Rattenhirn) nach unkompetitivem Mechanismus. Bestimmung nach der Methode von Hunter und Downs. (vgl. Abb. 30 und S. 139)

Glutathion-Reduktase aus Rattenhirn (EC 1.6.4.2)

(Reduced-NAD(P)-oxidized-glutathione oxidoreductase from rat brain)

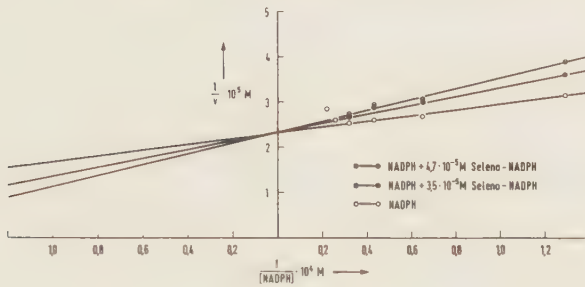


Abb. 5a: Kompetitive Hemmung der Glutathion-Reduktase-Reaktion (Rattenhirn) durch Seleno-NADP<sup>+</sup>.

Glutathion-Reduktase aus Rattenhirn (EC 1.6.4.2)

(Reduced-NAD(P)-oxidized-glutathione oxidoreductase, from rat brain)

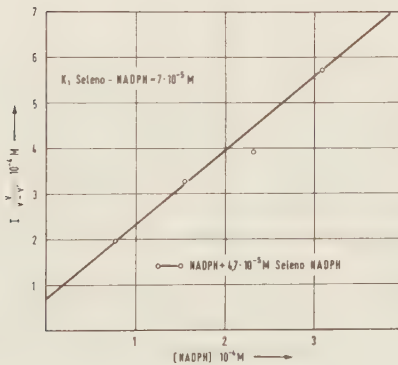


Abb. 5b: Hemmung der Glutathion-Reduktase nach kompetitivem Mechanismus. Bestimmung der Hemmkonstante nach Hunter und Downs.

*Isocitrat-Dehydrogenase aus Rattenhirn (EC 1.1.1.42)*  
(threo-D<sub>3</sub>-Isocitrate:NADP oxidoreductase, from rat brain)

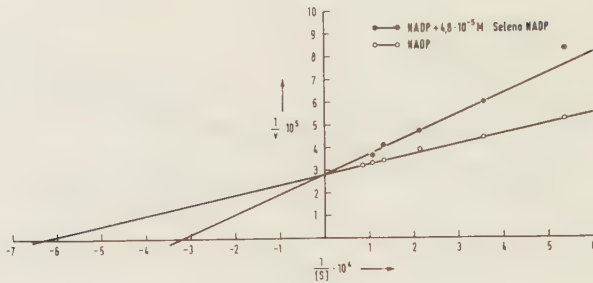


Abb. 6: Kompetitive Hemmung der Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion (Rattenhirn) durch Seleno-NADP<sup>+</sup>.

Bei den Reaktionen, die durch die cytoplasmatischen Enzyme aus Rattenhirn katalysiert wurden, hatte nur noch die Glucose-6-phosphat-DH eine meßbare Aktivität gegenüber Seleno-NADP<sup>+</sup>. Da die cytoplasmatischen Dehydrogenasen nur in Verdünnung vorlagen, konnten sie auch nicht in so hohen Konzentrationen, wie z. B. die käuflich erworbenen kristallisierten Enzyme, in die Reaktionsansätze eingesetzt werden. Es muß somit offenbleiben, ob die cytoplasmatischen Enzyme in gereinigter Form Seleno-NADP<sup>+</sup> hydrieren oder nicht.

Für die 3 cytoplasmatischen Dehydrogenasen, die in der eingesetzten Verdünnung keine Aktivität mehr gegenüber Seleno-NADP<sup>+</sup> zeigten, ist dieses unphysiologische Coenzym ein Hemmstoff. Der Hemmtyp ist meist kompetitiver Art, was bei einer strukturell so verwandten Verbindung, wie sie das Selen enthaltende

Coenzym-Analoge darstellt, nicht überraschend ist. Lediglich bei der 6-Phosphogluconat-DH aus Rattenhirn wurde in mehreren kinetischen Meßreihen eine unkompetitive Hemmung gefunden. Dieser Befund ist etwas verwunderlich - vor allem im Vergleich mit dem Hemmtyp des Hefe-Enzyms - und müßte deshalb noch gründlicher untersucht werden.

Die Hemm-Konstanten für das Seleno-NADP(H) liegen bei allen untersuchten Dehydrogenasen zwischen  $4 \cdot 10^{-5}$  M bis  $3 \cdot 10^{-4}$  M.

Die Tabellen 7, 8, 9 und 10 geben einen Überblick über die Ergebnisse, die in den kinetischen Untersuchungen mit Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup> gewonnen wurden.

Über die Bestimmung der Hemmtypen vergleiche auch Kapitel V (Kinetik), S. 136 - 139.

Hemmverhalten gegenüber  $\text{NADP}^+$  bzw.  $\text{NADPH}$ 

| Enzym                                             | Herkunft                                   | Name der Verbindung     | Hemmtyp                           | $K_i$                                        |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|
| Glucose-6-phosphat-dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.49) |                                            |                         |                                   |                                              |
| Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42)             | Schweineherz<br>Rattenhirn<br>(Cytoplasma) | Seleno- $\text{NADP}^+$ | gemischt-kompetitiv<br>kompetitiv | $1 \cdot 10^{-4}$ M<br>$4,3 \cdot 10^{-5}$ M |
| Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42)             | Schweineherz                               | Selenonicotinamid       | gemischt-kompetitiv               | $4,5 \cdot 10^{-5}$ M                        |
| 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.44)  | Hefe<br>Rattenhirn<br>(Cytoplasma)         | Seleno- $\text{NADP}^+$ | kompetitiv<br>unkompetitiv        | $1,4 \cdot 10^{-5}$ M<br>$3 \cdot 10^{-4}$ M |
|                                                   |                                            |                         |                                   |                                              |
| Glutathion-Reduktase<br>(EC 1.6.4.2)              | Hefe<br>Rattenhirn<br>(Cytoplasma)         | Seleno- $\text{NADPH}$  | nicht untersucht<br>kompetitiv    | nicht bestimmt<br>$7 \cdot 10^{-5}$ M        |

Vergleich von Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP in käuflich erworbenen NADP-abhängigen Oxidoreduktasen

1. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Hefe)

Seleno-NADP<sup>+</sup> wird genau so gut wie NADP<sup>+</sup> als Wasserstoff-acceptor verwendet. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substrat-Sättigung war für beide Coenzyme gleich groß. Thio-NADP<sup>+</sup> wurde nur unwesentlich langsamer hydriert.

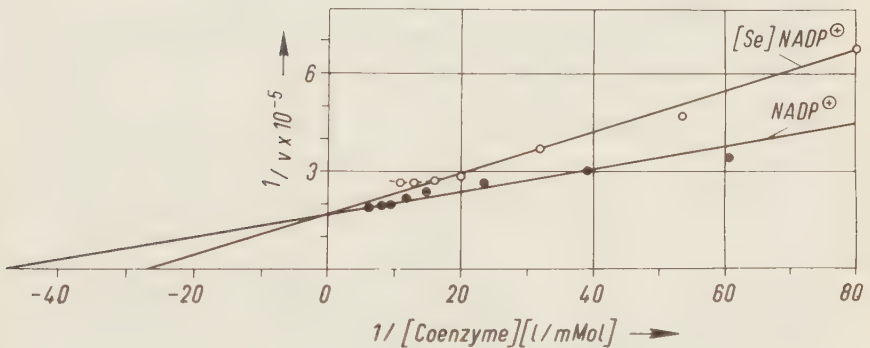


Abb. 7: Coenzym-Aktivität von Seleno-NADP<sup>+</sup> im Vergleich mit NADP<sup>+</sup> gegenüber Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (doppelt reziprokes Diagramm)

## 2. Phosphogluconat-Dehydrogenase (Hefe)

Im Gegensatz zur Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde Thio-NADP<sup>+</sup> wesentlich langsamer als NADP<sup>+</sup> durch die Phosphogluconat-Dehydrogenase reduziert. Seleno-NADP<sup>+</sup> wurde unter den gleichen Bedingungen so langsam hydriert, daß es nicht mehr meßbar war. Erst nachdem eine Enzymkonzentration von 0,56 U pro ml in der Test-Küvette erreicht war, konnte eine Wasserstoffübertragung mit Seleno-NADP<sup>+</sup> ( $3,8 \cdot 10^{-5}$  M) gut nachgewiesen werden, indem eine Absorptionsänderung von 0,012 bei 417 nm pro Minute zu beobachten war. Die Reaktionsgeschwindigkeit mit diesem Enzym war ungefähr 120mal geringer als mit NADP<sup>+</sup>. Seleno-NADP<sup>+</sup> erwies sich als ein kompetitiver Hemmstoff gegenüber NADP<sup>+</sup> bei der durch die Phosphogluconat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion. Die Hemm-Konstante betrug  $K_i = 1,4 \cdot 10^{-5}$  M.

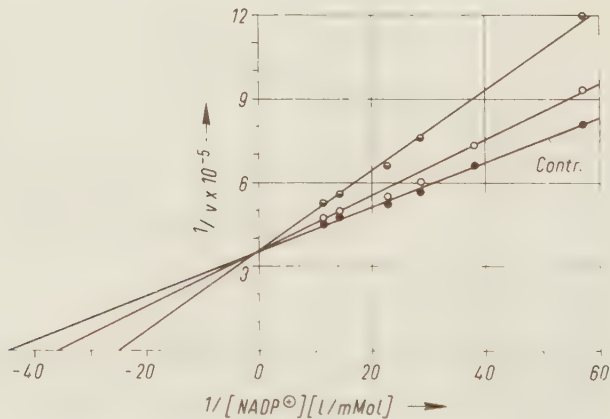


Abb. 8:

Kompetitive Hemmung der 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase-Reaktion durch Seleno-NADP<sup>+</sup>. Die NADP<sup>+</sup>-Konzentration wurde variiert und die Konzentration an Seleno-NADP<sup>+</sup> blieb jeweils konstant.

Kontrollen: ●—● ;  $9,36 \cdot 10^{-6}$  M Seleno-NADP<sup>+</sup> : ○—○ ;  
 $1,87 \cdot 10^{-5}$  M Seleno-NADP<sup>+</sup> : ◐—◐

### 3. Isocitrat-Dehydrogenase (Schweineherz)

Unter den gewählten Bedingungen reagierte die Isocitrat-Dehydrogenase mit Seleno-NADP<sup>+</sup> als Cofaktor nicht. Selbst bei einer hohen Enzymkonzentration von 3 U pro ml war keine Hydrierung des Analogen ( $8 \cdot 10^{-5}$  M) zu beobachten. Die Reduktion des natürlichen Coenzym<sup>+</sup>s wird durch Seleno-NADP<sup>+</sup> nach einem gemisch-kompetitiven Mechanismus gehemmt ( $K_i$  Seleno-NADP<sup>+</sup> =  $1 \cdot 10^{-4}$  M). Interessanterweise ist auch das freie Selenonicotinamid ein zumindest gleichstarker Hemmstoff für die durch die Isocitrat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion wie Seleno-NADP<sup>+</sup>. Die Inhibitor-Konstante für das Selenonicotinamid ist  $K_i = 4,5 \cdot 10^{-5}$  M.

Andererseits kann Thio-NADP<sup>+</sup> durch die Isocitrat-Dehydrogenase reduziert werden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch 60mal langsamer als diejenige mit dem natürlichen Coenzym. Die Michaelis-Konstanten für Thio-NADP<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> sind jedoch nahezu identisch bei diesem Enzym.

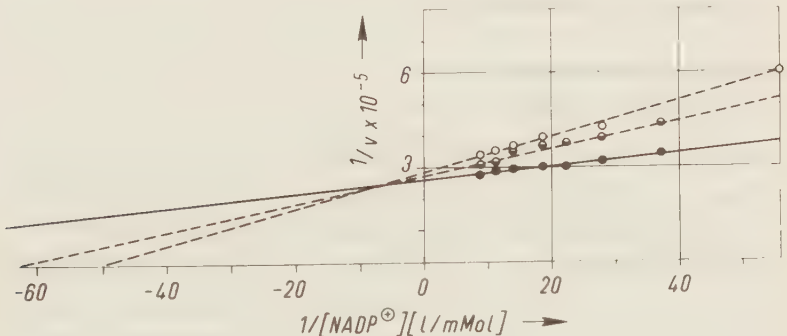


Abb. 9:

Gemisch-kompetitive Hemmung der Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion durch Seleno-NADP<sup>+</sup>,

Kontrollen: ●——●;  $3,2 \cdot 10^{-5}$  M Seleno-NADP<sup>+</sup> : ●———●;  
 $5,3 \cdot 10^{-5}$  M Seleno-NADP<sup>+</sup> : ○———○

Abb. 9

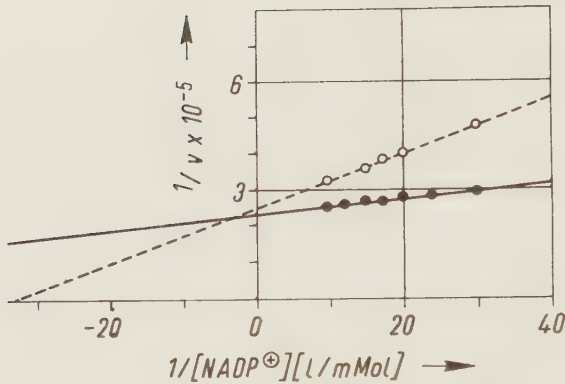


Abb. 10:

Gemischt-kompetitive Hemmung der Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion durch Selenonicotinamid.

Kontrollen: ● — ● ;  $1,46 \cdot 10^{-4}$  M Selenonicotinamid: ○ — — — ○

#### 4. Glutathion-Reduktase (Hefe)

Die Reduktion von oxydiertem Glutathion, welche durch die Glutathion-Reduktase katalysiert wird, verläuft mit Thio-NADPH als Wasserstoffdonator erheblich langsamer als mit NADPH. Die maximale Geschwindigkeit der Enzym-Reaktion ist ungefähr 20mal geringer als mit dem physiologisch vorkommenden Coenzym. Auch Seleno-NADPH wird durch die Glutathion-Reduktase oxydiert. Interessanterweise nimmt auch hier die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von NADPH über Thio-NADPH zum Seleno-NADPH deutlich ab, in Analogie zu den anderen untersuchten Dehydrogenasen.

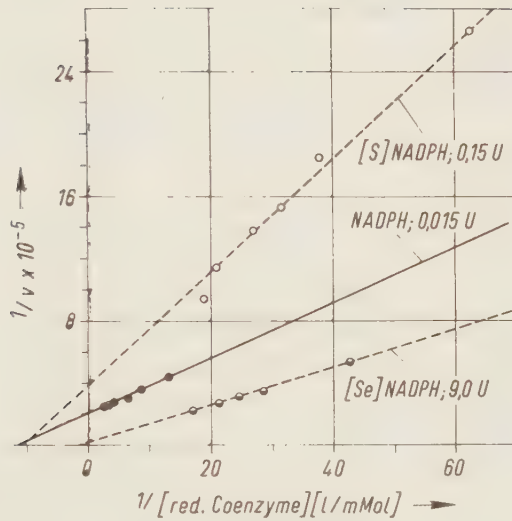


Abb. 11:

Doppelt-reziproke Diagramme für NADPH ●—●

Thio-NADPH ○---○ und Seleno-NADPH ●---●

Coenzym-Aktivität von Thio-NADPH und Seleno-NADPH im Vergleich mit NADPH gegenüber der Glutathion-Reduktase. Um Reaktionsgeschwindigkeiten in der gleichen Größenordnung für alle drei untersuchten Coenzyme zu erzielen, wurden jeweils verschiedene Enzymmengen zu den Testansätzen zupipettiert (wie angegeben).

Die Glutathion-Reduktase, die von uns verwendet wurde, enthielt als Verunreinigung bis zu 0.01 % einer unspezifischen "NADPH-Oxidase". Diese "NADPH-Oxidase" kann als Ursache der Seleno-NADPH-Oxidation ausgeschlossen werden,

K<sub>m</sub>-Werte von NADP<sup>+</sup>, Seleno-NADP<sup>+</sup> und Thio-NADP<sup>+</sup>

| Enzym                                             | Herkunft     | K <sub>m</sub> NADP <sup>+</sup><br>(Literaturwerte)                         | K <sub>m</sub> NADP <sup>+</sup><br>(Tris-Puffer pH 7.4; 3 · 10 <sup>-3</sup> M MgSO <sub>4</sub> , T = 23 - 26°C) | K <sub>m</sub> Seleno-<br>NADP <sup>+</sup> | K <sub>m</sub> Thio-NADP <sup>+</sup> |
|---------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.49) | Hefe         | 2,0 · 10 <sup>-5</sup> M<br>(Ref. 86) pH 8; 25°C<br>0,01 M MgCl <sub>2</sub> | 2,13 - 2,86 · 10 <sup>-5</sup> M                                                                                   | 3,78 · 10 <sup>-5</sup>                     | 5,72 · 10 <sup>-5</sup> M             |
| Isocitrat-Dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.42)          | Schweineherz | 2 · 10 <sup>-6</sup> M (Ref. 87)<br>pH 7; 37°C                               | 9,0 · 10 <sup>-6</sup> - 1 · 10 <sup>-5</sup> M                                                                    | -                                           | 1,38 · 10 <sup>-5</sup> M             |
| 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.44)  | Hefe         | 2,6 · 10 <sup>-5</sup> M<br>(Ref. 88), pH 7.5;<br>21°C                       | 2,25 - 4 · 10 <sup>-5</sup> M                                                                                      | nicht bestimmt                              | 4 · 10 <sup>-5</sup> M                |
|                                                   |              | K <sub>m</sub> NADPH                                                         | K <sub>m</sub> NADPH                                                                                               | K <sub>m</sub> Seleno-<br>NADPH             | K <sub>m</sub> Thio-NADPH             |
|                                                   |              |                                                                              | (Phosphat-Puffer, pH = 7.4; T = 23 - 26°C)                                                                         |                                             |                                       |
| Glutathion-Reduktase<br>(EC 1.6.4.2)              | Hefe         | 7,6 · 10 <sup>-6</sup> M<br>(Ref. 89), Phosphat-<br>Puffer pH 7.6;<br>25°C   | 8,8 · 10 <sup>-5</sup> M                                                                                           | 5 · 10 <sup>-4</sup> M                      | 9,5 · 10 <sup>-5</sup> M              |

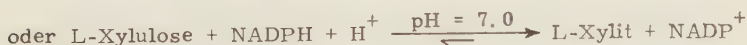
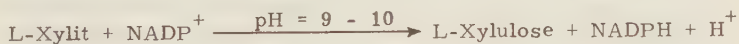
und zwar aus folgendem Grund: in jedem Testansatz mit Seleno-NADPH setzte ich 9 U Glutathion-Reduktase ein. Das bedeutet, daß rein rechnerisch eine Aktivität von 0,0009 U an unspezifischer "NADPH-Oxidase" hätte erwartet werden können. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm errechnete sich jedoch eine Enzym-Aktivität von 0,18 U.

#### 5. Alkohol-Dehydrogenase (Pferdeleber)

Es ist bekannt, daß aufgrund der geringen Coenzym-Spezifität der Pferdeleber Alkohol-Dehydrogenase  $\text{NADP}^+$  ebenfalls als Cofaktor von diesem NAD-abhängigen Enzym akzeptiert wird (90, 91). Bei der durch die Alkohol-Dehydrogenase katalysierten Reaktion wird der Wasserstoff mit A-Stereospezifität für den Nicotinamid-Ring übertragen, genau so wie bei der Isocitrat-Dehydrogenase (92, 100), die Seleno- $\text{NADP}^+$  nicht reduzierte. Es sollte nun geklärt werden, ob Thio- $\text{NADP}^+$  oder Seleno- $\text{NADP}^+$  durch die Alkohol-Dehydrogenase reduziert wird. Während Thio- $\text{NADP}^+$  mit diesem Enzym reagierte, konnte mit Seleno- $\text{NADP}^+$  als Coenzym keine Reduktion beobachtet werden (Inkubationsdauer 3 1/2 Stunden).

#### 6. L-Xylulose-Reduktase (Taubenleber)

Als weiteres  $\text{NADP}^+$ -spezifisches Enzym konnte L-Xylulose-Reduktase aus Taubenleber in großer Reinheit käuflich erworben werden. Über die Stereospezifität der Wasserstoffübertragung bei der L-Xylulose-Reduktase-Reaktion scheint bis heute noch nichts bekannt zu sein. Dieses Enzym katalysiert folgende Reaktionen:



Da nur ein Substrat, nämlich L-Xylit, käuflich zu erwerben war, konnte lediglich die bei völlig unphysiologischem pH-Wert ablaufende Reduktion des  $\text{NADP}^+$  untersucht werden. Bei einem pH-Wert von 9,0 (Tris-Puffer) verläuft schon die Hydrierung von  $\text{NADP}^+$  ziemlich langsam. Setzt man bei dieser Reaktion Thio- $\text{NADP}^+$  oder Seleno- $\text{NADP}^+$  als Coenzyme ein, so ist keine Reduktion mehr zu beobachten.

Bei pH 9,5 (Glycin-Puffer) werden von diesem Enzym  $\text{NADP}^+$ , 3-AcPyr $\text{ADP}^+$  und 3-OHC-Pyr- $\text{ADP}^+$  hydriert, jedoch nicht Thio- $\text{NADP}^+$  und Seleno- $\text{NADP}^+$ .

Die Xylulose-Reduktase und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Erythrocyten sind bisher die einzigen  $\text{NADP}^+$ -spezifischen Dehydrogenasen, welche Thio- $\text{NADP}^+$  als Cofaktor nicht mehr akzeptieren. (96)

Die Tendenz zur Abnahme der enzymatischen Hydrierbarkeit in der Reihe  $\text{NAD(P)}^+ > \text{Thio-NAD(P)}^+ > \text{Seleno-NADP}^+$  könnte vielleicht als Folge des geringeren positivierenden induktiven Effektes der Carbonsäurethioamid- bzw. -selenoamid-Gruppe erklärt werden, wenngleich das Verhalten der Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe dem widerspricht.

#### 7. Chemische Reduktion von Thio- $\text{NADP}^+$ und Seleno- $\text{NADP}^+$

Nach diesen Ergebnissen war zu prüfen, ob in Analogie zu der Abnahme der enzymatischen Hydrierbarkeit in verschiedenen Dehydrogenase-Systemen auch in der chemischen Reduzierbarkeit der beiden Analogen ein Unterschied besteht. Beide Coenzym-Analogue werden jedoch durch  $\text{NaBH}_4$  bei Zimmertemperatur rasch hydriert, und zwar sowohl in Tris-Puffer (0,2 M; pH 7,4) als auch in Phosphat-Puffer (0,066 M; pH 7,4).

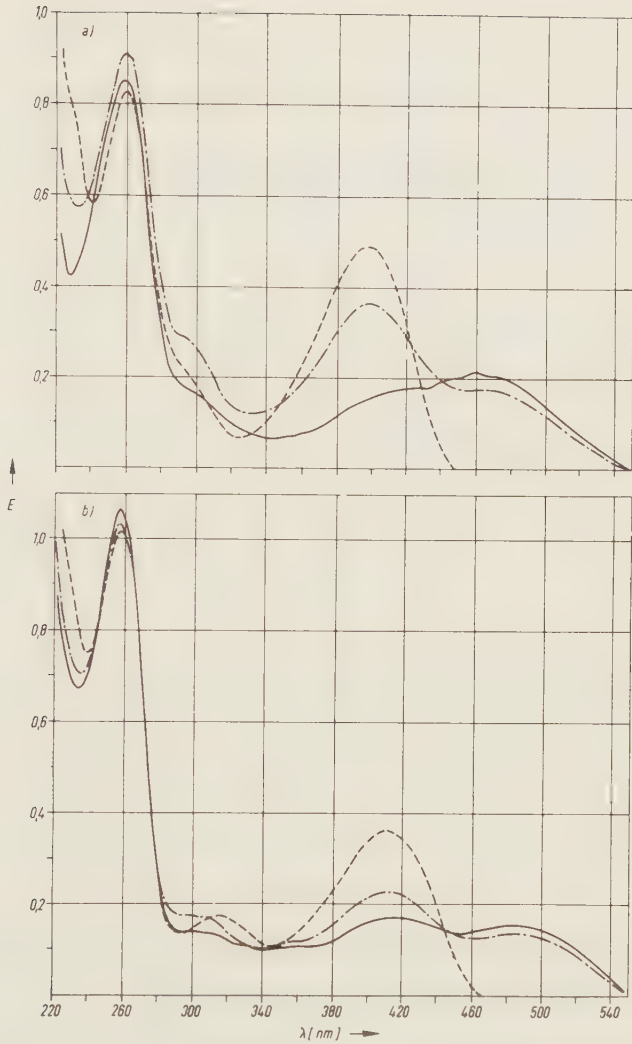


Abb. 12: Spektren von reduziertem Thio-NADP<sup>+</sup> (a) und reduziertem Seleno-NADP<sup>+</sup> (b):  
----- enzymatische Reduktion; -.-.- Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in Phosphat-Puffer; — Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in Tris-Puffer

Die Untersuchungen wurden deshalb in zwei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt, weil Chaykin bei der Reduktion von NAD(P) durch  $\text{NaBH}_4$  gefunden hatte, (93 - 95)

- a) daß die Art des Puffers einen Einfluß auf das Verhältnis der gebildeten Reduktionsprodukte (1,2-, 1,4- und 1,6-NADH) hat
- b) daß die Bildung der bei 395 nm absorbierenden Komponente (1,2-NADH) in Tris-Puffer begünstigt ist im Vergleich zur Hydrierung in Phosphat-Puffer.

Der Effekt des Phosphats auf den Verlauf der Borhydrid-Reduktion der Pyridin-Nucleotide konnte an den Thio- und Seleno-Analogen des NADP bestätigt werden. In den eigenen Untersuchungen war das Verhältnis der Produkte der  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion von Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup> in Phosphat-Puffer und Tris-Puffer deutlich verschieden.

Die Bildung der isomeren Dihydro-Komponente, mit dem Absorptionsmaximum in dem jeweils längsten Wellenbereich, war in Tris-Puffer im Vergleich zum Phosphat-Puffer begünstigt (das bei 465 nm absorbierende Reduktionsprodukt der "reduzierten Thio-NADP's" bzw. das bei 488 nm absorbierende Reduktionsprodukt der "reduzierten Seleno-NADP's"). (vgl. Abb. 12)

#### Diskussion der Coenzymaktivität von Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup> in verschiedenen Dehydrogenase-Systemen

Wenn der Sauerstoff in der Carbonamid-Gruppe des Nicotinamid-Restes des NADP<sup>+</sup> durch Schwefel oder Selen ersetzt wird, nimmt die Coenzym-Aktivität bei verschiedenen Reaktionen, die durch Dehydrogenasen katalysiert werden, mehr oder weniger stark ab.

Mit Ausnahme der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe werden Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup> durch alle untersuchten Dehydrogenasen langsamer reduziert als das natürliche Coenzym.

Eine fortschreitende Abnahme in der Reduzierbarkeit durch verschiedene Dehydrogenasen kann in der folgenden Reihe NADP<sup>+</sup> > Thio-NADP<sup>+</sup> > Seleno-NADP<sup>+</sup> beobachtet werden.

Kaplan berichtete 1959 über enzymatische Untersuchungen (81) mit Thio-NAD<sup>+</sup>. Diese Verbindung wird durch die Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber 3,48mal schneller hydriert als das physiologische Coenzym. Doch alle anderen von Kaplan untersuchten Dehydrogenasen setzen Thio-NAD<sup>+</sup> langsamer um als NAD<sup>+</sup>.

Tabelle 11

|                                                               | Pferdeleber | Hefe | Kaninchen-<br>muskel | Rinder-<br>herz | Kaninchen-<br>muskel          |
|---------------------------------------------------------------|-------------|------|----------------------|-----------------|-------------------------------|
|                                                               | ADH         | ADH  | LDH                  | LDH             | Glyceraldehyd-<br>phosphat-DH |
| Thio-NAD <sup>+</sup>                                         | 0,28        | 6,25 | 33,3                 | 2,43            | 6,25                          |
| relative reziproke Aktivität bezogen auf NAD <sup>+</sup> = 1 |             |      |                      |                 |                               |

modifiziert nach: B. M. Anderson and N. O. Kaplan  
J. Biol. Chem. 234 (1959), 1226-1232

Abgesehen von der Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase, die in ihrer Reaktion mit dem Coenzym offenbar einen Sonderfall darstellt, ist auch bei NAD-spezifischen Dehydrogenasen die Tendenz festzustellen, daß Thio-NAD<sup>+</sup> langsamer umgesetzt wird als NAD<sup>+</sup>. Da es nicht gelungen ist, ein Seleno-NAD<sup>+</sup> zu synthetisieren, konnte nicht festgestellt werden, ob sich auch bei den NAD<sup>+</sup>-Analogen die Tendenz einer Abnahme der Hydrierbarkeit in der Reihe NAD<sup>+</sup> > Thio-NAD<sup>+</sup> > Seleno-NAD<sup>+</sup> erkennen läßt.

Unter den untersuchten NADP-spezifischen Enzymen scheint die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe das, hinsichtlich des Coenzym, relativ am wenigsten spezifische Enzym zu sein. Es akzeptiert alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen hydrierbaren NADP<sup>+</sup>-Analoge: Thio-NADP<sup>+</sup>, 3-AcPyrADP<sup>+</sup>, 3-OHC-Pyr-ADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup>. Die Reduktion des 3-AcPyrADP<sup>+</sup> verläuft jedoch ziemlich langsam.

Demgegenüber berichteten 1961 Marks, Szeinberg und Banks, (96) daß Thio-NADP<sup>+</sup> nicht als Wasserstoffcarrier der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus menschlichen Erythrocyten wirksam ist, während 3-AcPyrADP<sup>+</sup> umgesetzt wird. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug allerdings auch weniger als 5 % derjenigen von NADP<sup>+</sup>. (96)

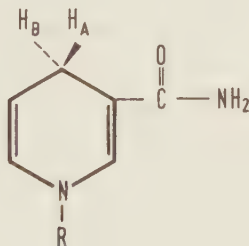
Die Isocitrat-Dehydrogenase aus Herzmuskel, die mit Thio-NADP<sup>+</sup> als Cofaktor 60mal langsamer reagiert als mit NADP<sup>+</sup>, zeigt Seleno-NADP<sup>+</sup> gegenüber eine so geringe Aktivität, daß keine Hydrierung mehr gemessen werden konnte. Die geringere Aktivität des Seleno-NADP<sup>+</sup> gegenüber vier der untersuchten Dehydrogenasen im Vergleich zu Thio-NADP<sup>+</sup> ist etwas überraschend, da die physikalisch-chemischen Unterschiede zwischen Schwefel und Selen im Vergleich zu denjenigen zwischen Sauerstoff und Schwefel relativ gering sind, (z. B. Elektronegativität, Atomradius, vgl. Einleitung, Tabelle 1).

### Zur Coenzym-Stereospezifität der untersuchten Dehydrogenasen

Aus den nun klassischen Arbeiten mit markierten Coenzymen und Substraten von Vennesland und Westheimer folgt, daß bei enzymatischen Reduktionen der Wasserstoff von der Stellung 4 des Dihydropyridin-Kernes im Coenzym direkt auf das Substrat und bei Oxydationen vom Substrat direkt in Stellung 4 des Pyridin-Kernes übertragen wird.

Diese Übertragung ist, wie Vennesland und Westheimer (97, 98) weiter zeigen konnten, nicht nur in Bezug auf das Substrat, sondern auch in Bezug auf das Coenzym stereospezifisch, indem dabei ausschließlich der eine oder der andere epimere Wasserstoff in Stellung 4, welche als A- und B-Wasserstoffe bezeichnet werden, reagiert.

Durch eine elegante Versuchsreihe ist es Cornforth, Popják u. Mitarb. (99) gelungen, die absolute Konfiguration der beiden Wasserstoffe A und B zu bestimmen, so daß wir über die Stereochemie des Kohlenstoffs 4 im Dihydropyridin-Teil der Coenzyme genau informiert sind.



Von beträchtlichem Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß bei den Reaktionen, die von Dehydrogenasen katalysiert werden, die Seleno-NADP(H) als Coenzym akzeptieren

[Glucose-6-phosphat-DH (Hefe), 6-Phospho-gluconat-DH (Hefe) und Glutathion-Reduktase (Hefe)] der Wasserstoff mit B-Stereospezifität auf den Nicotinamid-Ring des  $\text{NADP}^+$  übertragen wird. Nur die Isocitrat-Dehydrogenase (Herzmuskel) und die Alkohol-Dehydrogenase (Pferdeleber), die Seleno-NADP<sup>+</sup> nicht reduzierten, übertragen den A-Wasserstoff (92, 98, 100 - 102). Über die Stereospezifität der L-Xylulose-Reduktase-Reaktion ist bisher noch nichts bekannt.

Ein Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reduzierbarkeit des Seleno-NADP<sup>+</sup> und der Stereospezifität der Dehydrogenase ist jedoch mit den hier vorliegenden Daten nicht zu beweisen. Die Möglichkeit einer solchen Hypothese könnte am besten durch enzymatische Untersuchungen mit Seleno-NAD<sup>+</sup> überprüft werden, da die meisten der leicht zugänglichen NAD-abhängigen Dehydrogenasen den Wasserstoff mit A-Stereospezifität übertragen (21, 92).

## Versuche zur enzymatischen Dephosphorylierung von NADP-Analogen durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm katalysiert die Hydrolyse von Monoestern und Amiden der Orthophosphorsäure, jedoch auch diejenigen von Pyrophosphaten. Die Aktivitäten des Enzyms gegenüber den verschiedenen Substraten sind abhängig von der Konzentration des Enzyms, vom Puffer, vom pH-Wert des Reaktionsgemisches sowie von der Art und der Konzentration der Metallaktivatoren (105). Morton beschrieb 1955 (103, 104) die quantitative Umwandlung von  $\text{NADP}^+$  in  $\text{NAD}^+$  durch dieses Enzym. Die Reaktion kann auch für die Dephosphorylierung von NADPH zu NADH herangezogen werden, wie Nakamoto und Vennesland (100) in ihren Untersuchungen zur Stereospezifität der Wasserstoffübertragung durch  $\text{NADP}^+$ - und  $\text{NAD}^+$ -abhängige Dehydrogenasen gezeigt haben.

In den hier dargestellten Versuchen sollte die relativ geringe Spezifität der alkalischen Phosphatase ausgenutzt werden, um aus dem gut herstellbaren  $\text{NADP}^+$ -Analogon das Seleno- $\text{NAD}^+$  zu gewinnen. In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, wie sich die Thionicotinamid- bzw. 3-Acetylpyridin- und 3-Pyridincarbalddehyd-Analogen des  $\text{NADP}^+$  gegenüber der alkalischen Phosphatase verhalten.

Da die Untersuchungen von Fernley und Walker (105) es als sehr wahrscheinlich erscheinen lassen, daß die Phosphatase- und Pyrophosphatase-Aktivitäten auf das gleiche Enzym zurück-

zuföhren sind und es auch anderen Autoren nicht gelungen (106) war, die Pyrophosphatase-Aktivität von der Phosphomonoesterase-Aktivität abzutrennen, habe ich mich nicht darum bemüht, die käuflich erworbene alkalische Phosphatase weiter zu reinigen, sondern habe sie, wie geliefert, verwendet. Das pH-Optimum der alkalischen Phosphatase ist substratabhängig und liegt bei pH 9 - 10. Bei diesem pH-Wert sind die oxidierten Pyridinnucleotide jedoch instabil. Da das Ziel der Untersuchungen nicht zuletzt die Gewinnung des Seleno-NAD<sup>+</sup>-Analogen war, ließ ich die Phosphatase-Reaktion bei einem pH-Wert von 7,4 ablaufen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die relative Aktivität der alkalischen Phosphatase, bezogen auf NADP<sup>+</sup> als Substrat, bei pH 8,0 nur um knapp 10 % größer ist als bei pH 7,0. Erst bei einem pH-Wert von über 8 nimmt die relative Aktivität stärker zu.

### Ergebnisse und Diskussion

#### a) Dephosphorylierung von NADP<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> und von Thio-NADP<sup>+</sup> zu Thio-NAD<sup>+</sup>

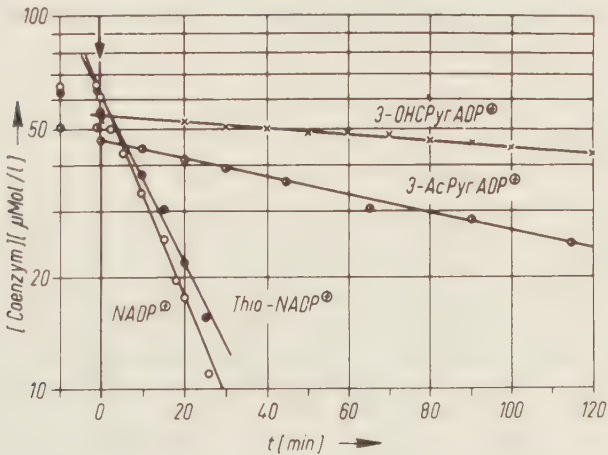
---

Wird NADP<sup>+</sup> durch die alkalische Phosphatase zu NAD<sup>+</sup> dephosphoryliert, so muß der Abnahme an NADP<sup>+</sup> eine entsprechende Zunahme an NAD<sup>+</sup> folgen.

Unter den gewählten Bedingungen (Triäthanolamin-hydrochlorid-Puffer 0,05 M; pH 7,4; 10<sup>-3</sup> M Mg<sup>2+</sup>; 10<sup>-4</sup> M Zn<sup>2+</sup>) war diese Forderung für NADP<sup>+</sup> erfüllt. Nach 50 min Inkubation ist kein NADP<sup>+</sup> mehr nachweisbar (vgl. Abb. 14) und es hat sich eine dem NADP<sup>+</sup> äquimolare Menge an NAD<sup>+</sup> gebildet. Die Umwandlung erfolgt demzufolge quantitativ.

Bei der Reaktion der alkalischen Phosphatase mit Thio-NADP<sup>+</sup> wurde jedoch bei der gleichen Inkubationszeit ein Verlust von

7 - 8 %, bezogen auf das gebildete Thio-NAD<sup>+</sup>, registriert. Dieser Verlust ist möglicherweise auf die Pyrophosphatase-Aktivität des Enzyms zurückzuführen. Nach den Untersuchungen von Fernley und Walker ist bei einer Magnesiumionenkonzentration von 10<sup>-3</sup> M nur eine geringe Hemmung zu erwarten. Erst durch Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen in der Größenordnung von 10<sup>-2</sup> M, wie sie Morton bei seinen Ansätzen verwendet hatte, wird die Pyrophosphatase-Aktivität stark vermindert. Die Umwandlung sowohl von NADP<sup>+</sup> als auch Thio-NADP<sup>+</sup> in die NAD<sup>+</sup>-Verbindungen verläuft in beiden Fällen nach einer Pseudo-erster-Ordnung-Reaktion. Die Halbwertszeit beträgt 10 min für NADP<sup>+</sup> und 13 min für Thio-NADP<sup>+</sup>.



Dephosphorylierung von NADP<sup>+</sup> ○—○ , Thio-NADP<sup>+</sup> ●—● ,  
3-AcPyrADP<sup>+</sup> ●—● und 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> ×—× durch  
die alkalische Phosphatase

Logarithmische Auftragung der Konzentration als Funktion der Zeit

Abb. 13

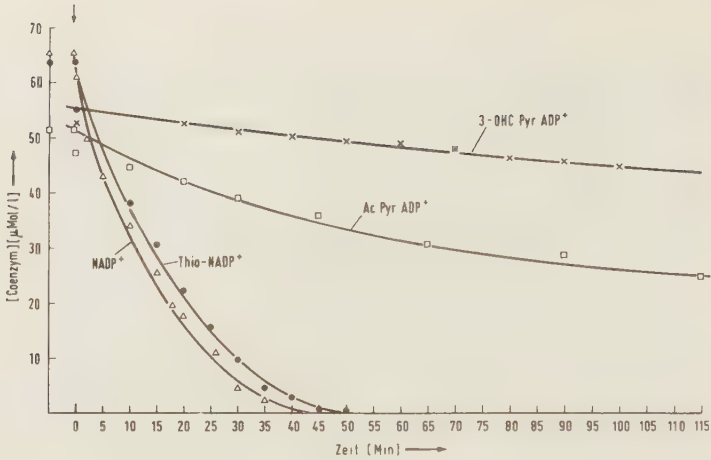


Abb. 14: Dephosphorylierung von  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{Thio-NADP}^+$ ,  $3\text{-AcPyrADP}^+$  und  $3\text{-OHCPyrADP}^+$  durch die alkalische Phosphatase. Auftragung als Funktion der Zeit

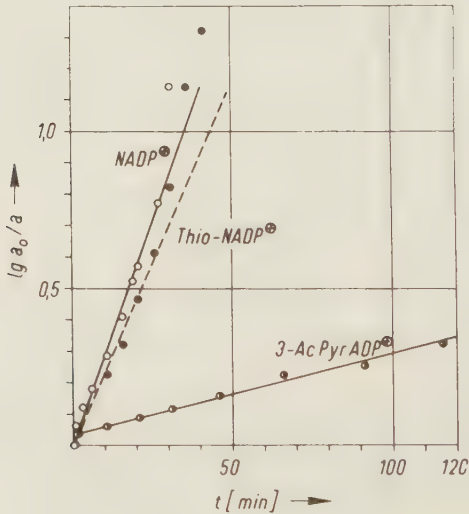


Abb. 15: Auftragung von  $\lg a_0/a$  als Funktion der Zeit ( $a_0$  bedeutet die Anfangskonzentration vor Zugabe der Phosphatase,  $a$  die zur Zeit  $t$  jeweils noch vorhandene Konzentration)

b) Dephosphorylierung von  $3\text{-AcPyrADP}^+$  zu  $3\text{-AcPyrAD}^+$

Die Abnahme der  $3\text{-AcPyrADP}^+$ -Konzentration im Inkubationsansatz wurde enzymatisch mit Hilfe der Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz verfolgt. Die Hydrierung des  $3\text{-AcPyrADP}^+$  durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus Hefe) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (aus Hefe) ist im Vergleich zu der des  $\text{NADP}^+$  so langsam, daß diese Reaktionen nicht zur Bestimmung geeignet waren.

Auch die enzymatische Hydrierung von  $3\text{-AcPyrADP}^+$  durch die Isocitrat-Dehydrogenase verläuft im Verhältnis zu der des  $\text{NADP}^+$  relativ langsam. Daher könnte bei einer schnell verlaufenden Reaktion der alkalischen Phosphatase mit  $3\text{-AcPyrADP}^+$  die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung die der Hydrierung übertreffen und dadurch zu einer falschen Interpretation der Meßwerte führen.

Zur Kontrolle wurde die Bildung der  $\text{NAD}^+$ -Analoge verfolgt. Da  $3\text{-AcPyrAD}^+$  durch die Alkohol-Dehydrogenase schneller als  $\text{NAD}^+$  hydriert wird, konnte sichergestellt werden, daß die Umwandlung des  $3\text{-AcPyrADP}^+$  in das  $\text{NAD}^+$ -Analoge durch die alkalische Phosphatase wesentlich langsamer verläuft als diejenige von  $\text{NADP}^+$  (vgl. Abb. 13). Die Halbwertszeit betrug unter den gewählten Bedingungen 100 min. Im Vergleich dazu verläuft die Hydrolyse des Phosphorsäuremonoesters am Adenosin beim  $\text{NADP}^+$  und Thio- $\text{NADP}^+$  etwa 10- bzw. 8mal so schnell.

Die Umwandlung des  $3\text{-AcPyrADP}^+$  in das  $3\text{-AcPyrAD}^+$  entspricht einem Spezialfall der Reaktion 2. Ordnung. Trägt man in einem Diagramm  $a_0/a$  gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade (vgl. Abb. 16), sie schneidet für  $t = 0$  die Ordinate beim Wert 1 bzw. die Abszisse bei  $t = 1/a_0 \times k$   
= - Halbwertszeit.

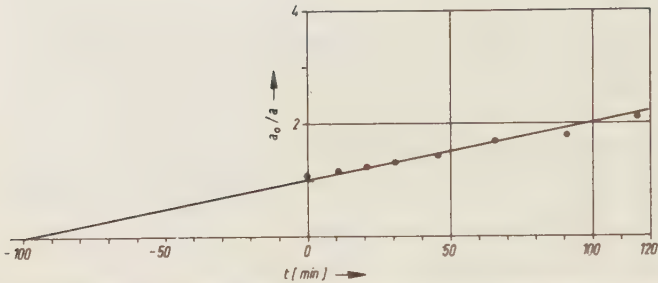


Abb. Dephosphorylierung von 3-AcPyrADP<sup>+</sup>.  $a_0/a$  als Funktion der Zeit aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt die Halbwertszeit ( $a_0$  = Anfangskonzentration,  $a$  = Konzentration zur Zeit  $t$ ).

Abb. 16

### c) Dephosphorylierung von 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> zu 3-OHCPyrAD<sup>+</sup>

Für diese Reaktion gelten analoge Überlegungen, wie sie beim 3-AcPyrADP<sup>+</sup> angestellt werden. Die enzymatische Hydrierung des 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> verläuft noch langsamer als diejenige des 3-AcPyrADP<sup>+</sup>. Die Reduktion des NAD<sup>+</sup>-Analogens des Pyridin-3-carbaldehyds läuft jedoch bei der gewählten (107) Äthanol-Konzentration (0.57 M) rascher ab als diejenige von NAD<sup>+</sup>, so daß eine Kontrolle der Phosphatase-Reaktion gegeben war. Der Umsatz des 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> ist noch geringer als der des 3-Acetylpyridin-Analogens (vgl. Abb. 13). Die Halbwertszeit betrug 330 min. Die Reaktionsordnung der Dephosphorylierung konnte nicht geklärt werden.

# d) Reaktion von Seleno-NADP<sup>+</sup> mit der alkalischen Phosphatase

Die Konzentration des Seleno-NADP<sup>+</sup> wurde enzymatisch mittels der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt. Die evtl. Bildung eines Seleno-NAD<sup>+</sup> wurde in 2 parallelen Ansätzen verfolgt. Der erste enthielt Alkohol-Dehydrogenase, wie unter Methoden beschrieben, der zweite enthielt Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase. Da wir annehmen, daß ein Zusammenhang zwischen der Stereospezifität der Wasserstoffübertragung und der Hydrierung von Seleno-NAD(P)<sup>+</sup> besteht, weil bisher nur Dehydrogenasen mit B-Stereospezifität mit Seleno-NADP<sup>+</sup> als Cofaktor reagiert haben, wurde ein Enzym gewählt, das den Wasserstoff mit A-Stereospezifität (Alkohol-Dehydrogenase) und ein Enzym, das ihn mit B-Stereospezifität (Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase) auf den Nicotinamidring des NAD<sup>+</sup> überträgt.

Bei der Inkubation von Seleno-NADP<sup>+</sup> mit der alkalischen Phosphatase war eine geringfügige Abnahme des Seleno-NADP<sup>+</sup> festzustellen (vgl. Abb. 17).

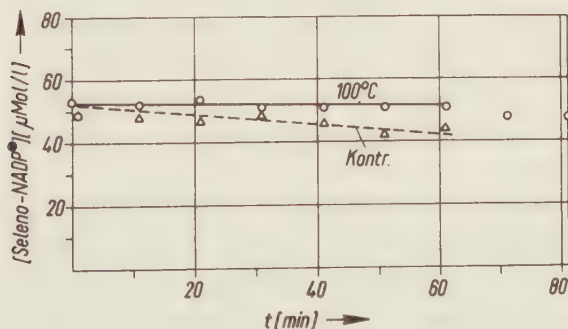


Abb. Reaktion der alkalischen Phosphatase mit Seleno-NADP<sup>+</sup>. ○—○: Inkubation mit hitzedenaturiertem Enzym; △---△: Inkubation mit unbehandeltem Enzym.

In den Küvetten zur  $\text{NAD}^+$ -Bestimmung war bei der Wellenlänge 417 nm eine Extinktionszunahme zu beobachten, die jedoch weniger als die Hälfte der Extinktionsabnahme von Seleno- $\text{NADP}^+$  betrug. Es wurde nun ein völlig identischer Inkubationsansatz mit hitzedenaturierter (bei  $100^\circ\text{C}$ ) alkalischer Phosphatase angesetzt (vgl. Abb. 17). Bei diesem Ansatz blieb die Seleno- $\text{NADP}^+$ -Konzentration über 60 min konstant, in den Küvetten der  $\text{NAD}^+$ -Bestimmung war jedoch gleichfalls eine Extinktionszunahme bei 417 nm von der gleichen Größenordnung wie bei der nicht behandelten Phosphatase festzustellen. Diese Extinktionszunahme ist daher wahrscheinlich unspezifisch.

Das Seleno- $\text{NADP}^+$  wird durch die alkalische Phosphatase offensichtlich nicht in ein Seleno- $\text{NAD}^+$  umgewandelt. Darüber hinaus ist Seleno- $\text{NADP}^+$  sogar ein Hemmstoff der alkalischen Phosphatase (vgl. Abb. 18). Denn schon in Anwesenheit von ca.  $3 \times 10^{-5}$  M Seleno- $\text{NADP}^+$  wird die Umwandlung des  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  um 50 % vermindert. Orientierende Versuche sprechen dafür, daß es sich um eine kompetitive Hemmung handelt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von Fernley und Walker, die für Hemmstoffe der alkalischen Phosphatase, welche selbst Phosphorsäureester sind, z.B.  $\beta$ -Glycerophosphat und Adenosin-5'-triphosphat, eine Hemmung vom kompetitiven Typ fanden.

Interessant in diesem Zusammenhang ist der Befund, daß das freie Selenonicotinamid kein Hemmstoff dieser Reaktion ist. Bei der durch die Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz katalysierten  $\text{NADP}^+$ -Hydrierung ist das Selenonicotinamid ein gleich starker Hemmstoff wie das Seleno- $\text{NADP}^+$ .

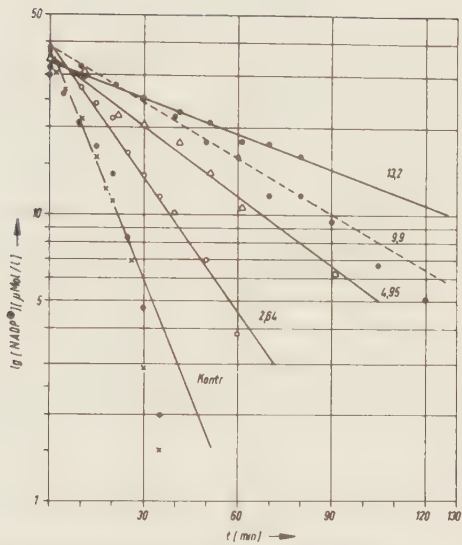


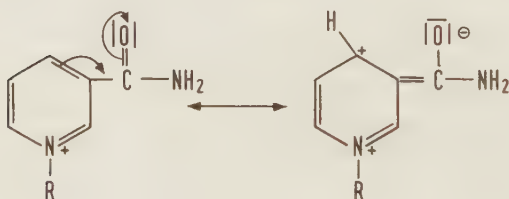
Abb. Hemmung der Dephosphorylierung von  $\text{NADP}^{\ominus}$  durch Seleno- $\text{NADP}^{\ominus}$ .  
 $\lg [\text{NADP}^{\ominus}]$  wurde als Funktion der Zeit aufgetragen. Inkubationsansatz s. Methoden.  
 ●—● und ×—×: Kontrollansätze ohne Seleno- $\text{NADP}^{\ominus}$ .  
 ○—○: in Anwesenheit von  $2,64 \times 10^{-5} \text{ M}$  Seleno- $\text{NADP}^{\ominus}$ .  
 △—△: in Anwesenheit von  $4,95 \times 10^{-5} \text{ M}$  Seleno- $\text{NADP}^{\ominus}$ .  
 ●—●: in Anwesenheit von  $9,9 \times 10^{-5} \text{ M}$  Seleno- $\text{NADP}^{\ominus}$ .  
 ●—●: in Anwesenheit von  $13,2 \times 10^{-5} \text{ M}$  Seleno- $\text{NADP}^{\ominus}$ .

# Substituenten in 3-Stellung am Pyridin-Ring und ihre Beziehung zur Coenzym-Funktion der Analogen ---

Bei der enzymatischen Reduktion von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  werden ausschließlich die monomeren 1,4-Dihydropyridin-Derivate  $\text{NADH}$  und  $\text{NADPH}$  gebildet. Folgender chemischer Mechanismus ist deshalb bei allen bekannten Wasserstoff-Transfer-Reaktionen als wahrscheinlich anzunehmen, bei denen Pyridinnucleotide beteiligt sind: (66, 67)



Die Ausbildung einer Elektronenlücke am C-Atom 4 des Pyridinringes wird durch den induktiven Effekt der Carbonamid-Gruppe begünstigt:



Das gleiche Schema kann auch für die 3-Acetylpyridin-Analogen des  $\text{NAD(P)}^+$  angenommen werden. Die Amid-Gruppe scheint also nicht wesentlich zu sein, da eine Zahl von Analogen, z. B. 3-Acetylpyridin- $\text{AD(P)}^+$  sowie das Pyridyl-3-carbaldehyd- $\text{AD(P)}^+$  mit einer Reihe Dehydrogenasen aktiv sind. (19, 81, 107)

Auch die Carbonylgruppe scheint ebensowenig die kritische Funktion zu sein. Es war bekannt (Kaplan et al.), daß die  $\text{—C(=S)—NH}_2$ -Gruppe im Thionicotinamid- $\text{AD}^+$  und  $\text{—C(=N)—OH}$

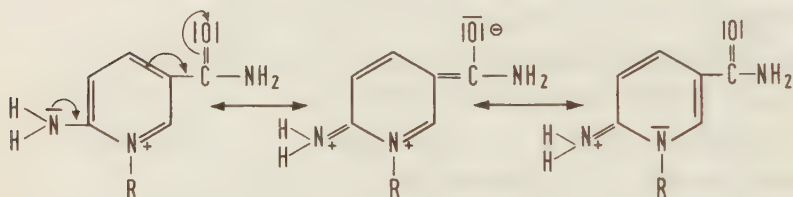
im Pyridyl-3-aldoxim-AD<sup>+</sup> die entsprechenden Analogen (19, 81) durchaus befähigen, NAD in verschiedenen Enzymen zu ersetzen. In jüngster Zeit konnte Biellmann zeigen, daß auch das 3-Cyanopyridin-AD<sup>+</sup> Coenzym-Aktivität besitzt. (108) Ein entsprechendes NADP<sup>+</sup>-Analoges ist bisher nicht synthetisiert worden, so daß über dessen Aktivität nichts bekannt ist.

Wird in der Carbonamid-Gruppe des Nicotinamids der Sauerstoff durch Selen ersetzt, also durch ein elektropositiveres Element als Stickstoff und Schwefel, so besitzt zumindest das entsprechende NADP<sup>+</sup>-Analoge in Dehydrogenase-Systemen mit B-Stereospezifität Coenzym-Aktivität, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde.

Coenzym-Analoge (z. B. 3-methylpyridin-AD<sup>+</sup>, 3-Pyridyl-methylcarbinol-AD<sup>+</sup>, 3-Aminopyridin u. a.), die keine Doppelbindung in der Seitenkette enthalten, werden weder (19, 21) enzymatisch durch Dehydrogenasen noch chemisch durch Dithionit reduziert. Diese Inaktivität kann mit dem induktiven Effekt dieser Gruppen erklärt werden. Kaplan synthetisierte ein in diesem Zusammenhang interessantes NAD<sup>+</sup>-Analoges, dessen Pyridin-Kern in 3-Stellung eine — CH = CH - CONH<sub>2</sub>-Gruppe enthält. Dieses 3-Pyridyl-acryloamid-AD<sup>+</sup> ist zwar chemisch hydrierbar, jedoch nicht auf enzymatischem Wege. (19, 21)

Der induktive Effekt der Amino-Gruppe in 6-Stellung des Pyridin-Rings kann auch zur Erklärung der Nichthydrierbarkeit der NAD(P)-Analoge des 6-Aminonicotinamids herangezogen werden. Die in vitro und in vivo entstehenden unphysiologischen Coenzyme sind enzymatisch nicht mehr hydrierbar und können daher für die Oxidoreduktasen der Zelle nicht mehr als Wasserstoffcarrier fungieren. Für einige Dehydrogenasereaktionen sind sie sogar sehr starke Hemmstoffe. (83, 85, 109)

Kaplan berichtete 1961, daß das 6-ANAD<sup>+</sup> chemisch durch Dithionit nicht reduziert werden kann. Auch die Modell-Substanz, das 6-Aminonicotinamid-Methojodid ist weder durch Dithionit noch durch NaBH<sub>4</sub> hydrierbar. Dies könnte mit dem Zusammenwirken der verschieden gerichteten induktiven Effekte der Amino-Gruppe in 6-Stellung und der Carbonamid-Gruppe in 3-Stellung erklärt werden, so daß die Ausbildung einer Elektronen-lücke am Pyridin-Ring als Angriffsstelle eines nucleophilen Agens kaum möglich ist.



Da auch die Hydrierung mit Dithionit über eine Addition (110-112) des Sulfat-Ions NaO<sub>2</sub>S<sup>⊖</sup> und anschließende Hydrolyse verläuft ( 21 ), ist es erklärbar, daß das 6-Aminonicotinamid-Methojodid sowie 6-AN-AD(P) auch chemisch nicht hydriert werden können.

Analoge Überlegungen gelten auch für das 6-Amino-thio-nicotinamid-Methojodid, das - erwartungsgemäß - chemisch weder mit Dithionit noch mit NaBH<sub>4</sub> hydrierbar ist.

Mit dem induktiven Effekt der verschiedenen Substituenten im Pyridin-Ring allein können jedoch nicht alle unerwarteten Befunde an NAD(P)-Analogen erklärt werden, z.B. die enzymatische Inaktivität des α-NAD<sup>+</sup> oder des N'-monomethyl- bzw. N,N-dimethylnicotinamid-adenin-dinucleotids. (113, 117)

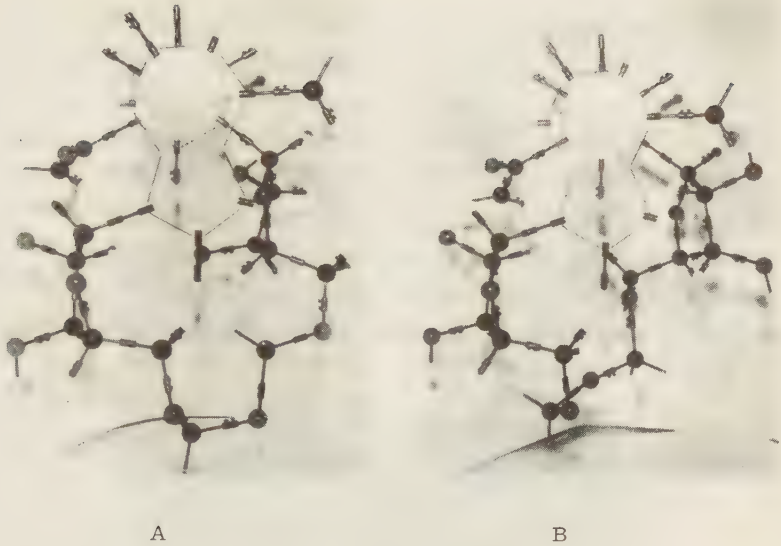


Abb. 19

A. - Ansicht eines Skelett-Modells von  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>.

Die Umgrenzungslinie der Adenin-Base ist ausgezogen, diejenige der Pyridin-Base gestrichelt.

Der Pyridin-Ring liegt unterhalb der Ebene des Adenins.

B. - Ansicht eines Skelett-Modells von  $\alpha$ -NAD<sup>+</sup>

Eine zumindest gleich wichtige Rolle spielt die räumliche Orientierung der Coenzym-Moleküle und die relative Lage der Substituenten zueinander, die N. O. Kaplan in allerjüngster Zeit mit Hilfe der 220-MHz-Kernresonanz-Spektroskopie erforscht hat. (114 - 118)

In der Inaktivität des  $\alpha$ -NAD<sup>+</sup> mit Dehydrogenasen mag die veränderte Geometrie des Pyrophosphat-"Rückgrates" (vgl. Abb. 19) zum Ausdruck kommen. Kaplan vermutet, daß die räumliche

Orientierung der Phosphat-Gruppen eine kritische Rolle bei der Bindung des Coenzym an das Enzymprotein spielt.

Dafür spricht auch, daß die  $\text{NAD}^+$ -Analoge, die an der Pyrophosphat-Gruppe verestert wurden ( 76 ), enzymatisch inaktiv sind. (21)

Kaplan postuliert, daß die Pyridin-Coenzyme in 3-Strukturen existieren können - einer offenen Form und zwei gefalteten Strukturen - . Die gefalteten Strukturen sind schematisch in Abb. 20 dargestellt.



Abb. 20

Sie unterscheiden sich durch die relativen Positionen, in denen sich die Pyridin- und Purin-Ringe zueinander befinden. Sie können auch beschrieben werden als (1) eine Struktur, in welcher der Purin-Ring über dem Pyridin-Ring liegt (M-helix) und als eine Conformation, in welcher der Pyridin-Ring über dem Purin-Ring liegt (P-helix). Aus den enzymatischen Studien mit NADH und NADPH geht hervor, daß die beiden Zwillingsprotonen am C-Atom 4 des Pyridin-Rings chemisch verschieden sein müßten und deshalb im Magnetfeld unterscheidbar sein sollten. Kaplan gelang es mit Hilfe eines 220-MHz-Kernresonanzsystems nachzuweisen, daß die beiden Protonen am C-4 in NADH und NADPH magnetisch nicht äquivalent sind.

Es ist daher von größter Bedeutung, daß im 220-MHz-Kernresonanzspektrum des hydrierten Nicotinamid-Mononucleotids nur ein Singulett beobachtet werden kann. Dies würde zeigen, daß der chemische Unterschied zwischen den beiden C-4-Zwillingsprotonen aus der Wechselwirkung des Purinrings mit dem reduzierten Pyridin-Ring resultieren und aus der Tatsache, daß die beiden Protonen (A und B) bedingt durch die zwei Conformationen (P- und M-helix) in verschiedener Umgebung existieren.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, daß ein größerer chemischer Unterschied besteht zwischen den beiden C-4-Protonen des NADPH (28,8 Hz) verglichen mit den beiden Protonen des NADH (21,4 Hz). (114)

Die Unterschiede in der Spezifität der A und B-dehydrogenasen gegenüber NADH und NADPH können möglicherweise mit deren Fähigkeiten zusammenhängen, die M- und P-Helix zu erkennen. Eine Dehydrogenase vom A-Typ

würde nur für die M-helix spezifisch sein und der B-Typ würde nur mit der P-helix reagieren. Es ist die Hypothese von Kaplan, daß die beiden Helices miteinander im Gleichgewicht stehen und daß ihre gegenseitige Umwandlung über eine offene Form vor sich geht (vgl. Abb. 21 ). Nach den Untersuchungen von Kaplan scheint die Umwandlung der 2 Helices langsam zu verlaufen, d.h. innerhalb der Zeitspanne, die bei der NMR-Spektroskopie auftreten ( 1 bis 10 Millisekunden).

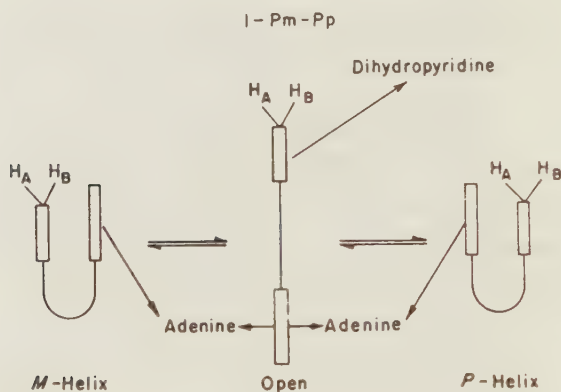


Abb. 21

Bis heute liegen jedoch zu wenige oder sich widersprechende Untersuchungen darüber vor, ob NADH sich auffaltet, wenn es an Enzyme (wie z.B. Lactat-DH, Alkohol-DH, Glutamat-DH) gebunden wird, oder ob die Coenzyme in einer gefalteten Conformation vorliegen. (119 - 122)

Es ist jedoch offensichtlich, daß die Geometrie der Pyridin-Nucleotide eine entscheidende Rolle bei deren funktionellen und stereospezifischen Eigenschaften spielt.

Vielleicht tragen Wechselwirkungen zwischen der Carbonamid-Gruppe des Nicotinamid-Ringes und der in 2-Stellung sitzenden Phosphat-Gruppe des  $\text{NADP}^+$  und seiner Analogen zu deren Stabilisierung bei. Dies könnte eventuell eine Erklärung dafür sein, daß vom 5-Fluor-nicotinamid und vom Seleno-nicotinamid zwar  $\text{NADP}^+$ -Analoge gebildet werden, es jedoch bisher nicht gelang, entsprechende  $\text{NAD}^+$ -Analoge herzustellen.

### Kapitel III

#### 1. Coenzym-Modell-Substanzen

N<sup>1</sup>-Methyl-nicotinamid und andere quaternäre Pyridinium-Verbindungen wurden erstmals in den Jahren 1936 und (123-126) 1937 von P. Karrer und seinem Arbeitskreis als Modellsubstanzen zur Aufklärung der Struktur des reduzierten NAD benutzt. Später haben vor allem K. Wallenfels und Mitarbeiter wertvolle Erkenntnisse zum Mechanismus des Wasserstofftransfers mit Hilfe von Modelluntersuchungen beigetragen. In ihren Experimenten verwendeten letztere vor allem Pyridinium-Salze, die mit 2,6-Dichlorbenzylbromid alkyliert waren. (66, 67, 127)

Coenzym-Modellverbindungen sind von großem theoretischen Wert, weil bei ihnen der Beitrag des Adeninrestes zu den Absorptionsspektren eliminiert wird und sich daher Änderungen in den Spektren als Änderungen im Pyridin-Ring interpretieren lassen.

Während sich viele substituierte Pyridine wie z. B. Nicotinamid, 3-Acetylpyridin und 6-Aminonicotinamid mit sehr guten Ausbeuten direkt in die entsprechenden quaternären Verbindungen überführen lassen, ist dies bei Pyridin-carbonsäurethioamiden nicht möglich. Versucht man z. B. Thionicotinamid mit Methyljodid (Shifrin, 1963) oder 2,6-Dichlorbenzylbromid (Wallenfels, 1959, 127) direkt zu alkylieren, so erhält man keine einheitlichen Reaktionsprodukte, sondern Gemische mit unangenehmem Mercaptan-Geruch.

Die von S. Shifrin beschriebene Synthese des Thionicotinamid-Methojodids durch Zusammenschmelzen von N<sup>1</sup>-Methyl-Nicotinamid mit Phosphorpentasulfid ließ sich nicht auf das entsprechende 6-Amino-Derivat übertragen.

Dagegen ist es - wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird - gelungen, alle Methojodide von Pyridincarbonsäurethioamiden mit sehr guter Ausbeute aus den N<sup>1</sup>-alkylierten Nitrilen zu erhalten. Die Synthese eines Selenonicotinamid-Methojodids gelang jedoch nicht.

Die so gewonnenen Coenzym-Modelle wurden einerseits mit Natriumdithionit in 9 %iger Natriumbicarbonat-Lösung und andererseits mit Natriumborhydrid in Tris-Puffer (0.2 M; pH 7.4), Phosphat-Puffer (0.066 M; pH 7.4) und Wasser hydriert.

Während bei der Umsetzung mit Dithionit nur die N<sup>1</sup>-Methyl-1,4-dihydropyridin-Derivate entstehen, können bei der Hydrierung mit Natriumborhydrid auch die isomeren 1,2- bzw. 1,6-Dihydropyridin-Verbindungen erwartet werden.

## 2. Hydrierbarkeit der Modellsubstanzen

Die Methojodide des 6-Amino-nicotinamids und des 6-Aminothionicotinamids sind chemisch nicht hydrierbar, ebensowenig wie 6-ANAD(P). Dies kann mit dem elektronenschiebenden Effekt der Amino-Gruppe in 6-Stellung erklärt werden.

Interessante Befunde ergeben sich bei der Reduktion des Thionicotinamid-Methojodids. Setzt man es mit Dithionit um, so entsteht das 1-Methyl-1,4-dihydrothionicotinamid, das von Shifrin 1963 beschrieben wurde. Als Absorptionsmaximum gibt dieser Autor - allerdings in Methanol - eine Wellenlänge von 412.5 nm an. Die entsprechenden 1,4-Dihydroderivate der Thionicotinamid-adenin-dinucleotide absorbieren bei 398 nm. (46, 47, 166, 185)

Die Hydrierung des Thionicotinamid-Methojodids mit NaBH<sub>4</sub> führt in den verschiedenen Puffersystemen zur Bildung ganz unterschiedlicher Mengen an isomeren Reduktionsprodukten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen bei der chemischen Reduktion des Thio-NADP<sup>+</sup> (vgl. S. 47 ).

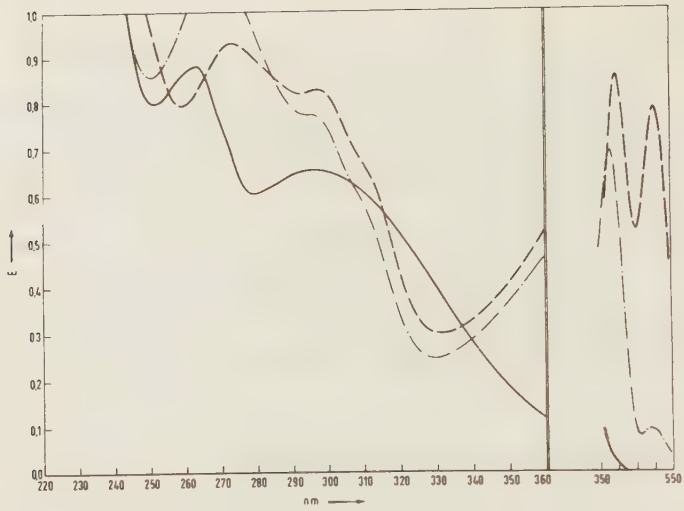


Abb. 22 a

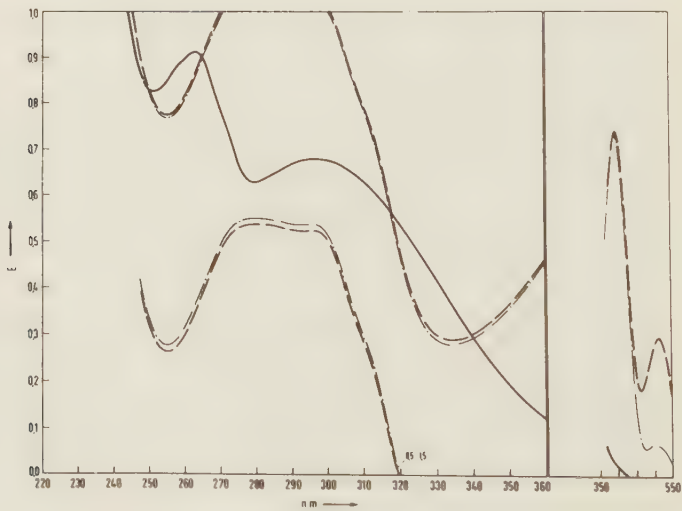


Abb. 22 b

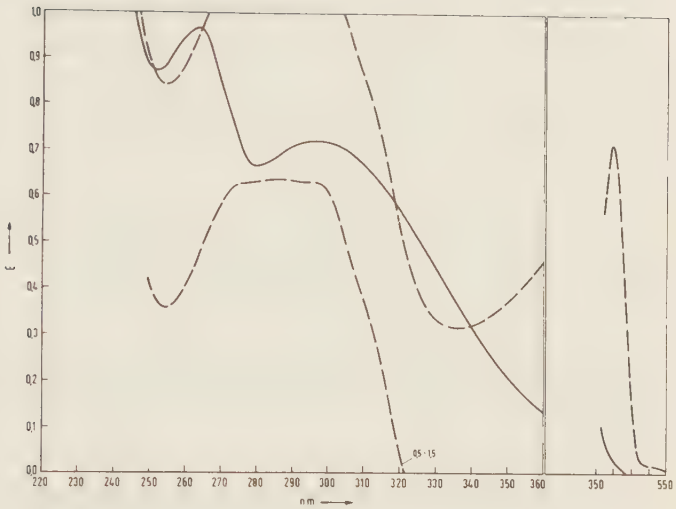


Abb. 22 c

Abb. 22: Spektren von Nicotinsäurethioamid-N<sup>1</sup>-methyljodid ( — )

a) Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in Wasser

b) Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in Tris-Puffer

c) Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> in Phosphat-Puffer

----- unmittelbar nach Zugabe des NaBH<sub>4</sub>

- . - . - ca. 30 Minuten danach

- a) Hydriert man in Wasser, so färbt sich die Lösung nach Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  rot. Im Spektrum sind zwei fast gleich intensive Absorptionsbanden bei 505 nm und bei 398 nm sowie eine weitere Bande bei 273 nm zu sehen (im Differenzspektrum - gemessen gegen die nicht hydrierte Verbindung - liegt dieses letztere Absorptionsmaximum bei 276 nm). Die Farbe der Lösung ändert sich mit der Zeit (ca. 30 Minuten) von rot nach gelb. Parallel dazu verschwindet die Absorptionsbande bei 505 nm. (Abb. 22a)
- b) Hydriert man in Tris-Puffer, so färbt sich auch hier die Lösung zunächst rot. Die Bildung des isomeren Reduktionsproduktes, das bei 505 nm absorbiert, ist jedoch in Tris-Puffer wesentlich weniger begünstigt als in Wasser. Auch in Tris-Puffer ist dieses Hydrierungsprodukt instabil und die Extinktion bei 505 nm nimmt mit der Zeit ab. (Abb. 22b)
- c) Bei der Reduktion in Phosphat-Puffer wird die bei 505 nm absorbierende Komponente überhaupt nicht mehr gebildet. Die Lösung ist nach Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  gelb gefärbt. Im längerwelligen Bereich ist nur die Bande bei 398 nm zu sehen. (Abb. 22c)

Genau wie beim Thio- $\text{NADP}^+$  kann bei der Modells substanz ein starker Einfluß des Puffermediums auf den Verlauf der  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion festgestellt werden. Auch bei Hydrierung der Modells substanz ist die Bildung der Komponente, die ein Absorptionsmaximum im längsten Wellenbereich besitzt (vermutlich das 1,2-Dihydropyridin), in Tris-Puffer begünstigt im Vergleich zum Phosphat-Puffer. (vgl. S. 46 und 47)

Das Methojodid des Isonicotinsäurethioamids ließ sich erwartungsgemäß mit Dithionit nicht reduzieren. Dagegen trat nach Hydrierung mit  $\text{NaBH}_4$  in Phosphatpuffer im UV-Spektrum ein zusätzliches Maximum bei 285 nm auf. Es liegt nahe, daß es sich um die 1,2 - bzw. 1,6-Di-hydroprodukte handelt, die in diesem Falle identisch sind.

Behandelt man das Isonicotinsäurethioamid- $\text{ADP}^+$  mit  $\text{NaBH}_4$ , so ist im Differenzspektrum gegen Isothio- $\text{ADP}^+$  ox. eine Absorptionsbande bei 293 nm zu sehen. Dies stimmt gut mit dem Befund an der Modells substanz überein und kann als Beweis herangezogen werden, daß tatsächlich ein  $\text{NADP}^+$ -Analoges des Isonicotinsäurethioamids vorliegt.

Vom Selenonicotinamid ist es - wie erwähnt - nicht gelungen, ein Methojodid herzustellen.

Seleno- $\text{NADP}^+$  wurde mit  $\text{NaBH}_4$  in verschiedenen Puffern hydriert, und es ergaben sich ähnliche Verhältnisse der Hydrierungsprodukte wie bei der Reduktion des Thio- $\text{NADP}^+$  (vgl. S. 46 und 47).

3. Zur Synthese von Carbonsäure-Thioamiden und -Selenoamiden des Pyridins, deren N<sup>1</sup>-Methylderivaten und einigen S-Oxiden sowie N-Oxiden

---

Nicotinsäurethioamid, Isonicotinsäurethioamid, 6-Amino-nicotinsäurethioamid, Nicotinsäureselenoamid und Benzoessäureselenoamid wurden durch Addition von Schwefelwasserstoff bzw. Selenwasserstoff an die entsprechenden Nitrile gewonnen. Generell wurde zunächst nach der von Karrer und Schukri 1945 beschriebenen Methode gearbeitet, bei der das Nitril in mit Ammoniak-Gas gesättigtem Äthanol umgesetzt wird. (41) Bei den Pyridincarbonsäurethioamiden wurden jedoch in den meisten Fällen wesentlich bessere Ausbeuten erzielt, wenn nach der Methode von Fairfull, Lowe und Peak (1952) in wasserfreiem Pyridin mit Triäthylamin als katalytischem Agens gearbeitet wurde. (128)

Während 3-Cyano-pyridin, 4-Cyanopyridin und Benzonitril käuflich zu erwerben waren, bereitete die Synthese von 6-Amino-3-cyanopyridin zunächst Schwierigkeiten. Diese Substanz wurde erstmals 1928 von Räth und Prange beschrieben. (129) Die Synthese, die über 2,5-Diamino-pyridin mit anschließender Sandmeyer-Reaktion läuft, ist nicht sehr ergiebig. 1944 wurde 6-Amino-3-cyanopyridin von Caldwell, Tyson und Lauer durch Zusammenschmelzen von 2-Amino-5-brompyridin und Kupfer (I)-cyanid und anschließende Sublimation gewonnen. (130)

Ein von Gregory, Holt und Slack 1947 angegebener Syntheseweg, wobei 2-Amino-5-jodpyridin in Pyridin mit Kupfercyanid umgesetzt wird, brachte bessere Ausbeuten. Im Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit nach letztgenannter Methode verfahren. Käufliches 2-Amino-5-brompyridin wurde in wasserfreiem Dimethylformamid mit Kupfercyanid umge-

setzt, das Dimethylformamid abdestilliert und das 6-Amino-3-cyanopyridin im Vakuum sublimiert. Die vorteilhafte Verwendung von Dimethylformamid als Lösungsmittel bei der Herstellung von Nitrilen aus Arylhalogeniden und Kupfercyanid wurde 1961 von Friedman und Shechter beschrieben. (132)

Eine Darstellung von 6-Amino-3-cyanopyridin aus dem entsprechenden Carbonsäureamid durch Dehydratisieren mit Phosphorpentoxid - ein Weg, den Russo 1961 zur Synthese (133) des 2-Amino-4-cyanopyridins benutzt hat - erwies sich als ungeeignet.

Neben den oben beschriebenen Methoden zur Gewinnung der Pyridincarbonsäurethioamide durch Umsetzung der Nitrile mit Schwefelwasserstoff wurde beim 6-Amino-nicotinsäureamid eine direkte Schwefelung mit Phosphorpentasulfid versucht. (134)

Beim Kochen von 6-AN und Phosphorpentasulfid in wasserfreiem Pyridin (134) wurde als Hauptreaktionsprodukt 6-Amino-3-cyanopyridin isoliert. Bei unsubstituierten Carbonsäureamiden ist eine Dehydratisierung bei Umsetzung mit Phosphorpentasulfid keineswegs ungewöhnlich.

Das Zusammenschmelzen von 6-Amino-nicotinamid mit  $P_2S_5$  ergab zwar eine Substanz, deren UV-Spektrum mit demjenigen des 6-Amino-thionicotinamids identisch war, die Ausbeute und die Aufarbeitung waren jedoch unbefriedigend.

Die Synthese des Nicotinsäureselenoamids verlief glatt durch Addition von Selenwasserstoff an 3-Cyanopyridin in mit Ammoniak-Gas gesättigtem Äthanol. Bei der Reinigung wurde das Rohprodukt zunächst aus heißem Wasser umkristallisiert. Bei späteren Chargen erwies sich jedoch das Umkristallisieren aus n-Propanol unter Stickstoff-Atmosphäre

als optimale Methode. Das so gewonnene Selenonicotinamid wurde unter Stickstoff in Ampullen aus braunem Glas eingeschmolzen. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, ist es wenigstens 12 Monate unzersetzt haltbar.

Dagegen war das ebenfalls aus n-Propanol umkristallisierte Benzoessäureselenoamid nur wenige Wochen stabil.

Bei der Darstellung der Methojodide wurde zunächst das Zusammenschmelzen der entsprechenden  $\text{N}^1$ -methylierten Carbonsäureamide mit Phosphorpentasulfid versucht. Die Synthese des Thionicotinamid-Methojodids aus dem entsprechenden Nicotinamid-Derivat läßt sich auf diesem Wege (46) (vgl. Shifrin) mit guter Ausbeute durchführen. Das 6-Amino-Thionicotinamid-Methojodid konnte trotz aller Anstrengungen mit dieser Methode nicht hergestellt werden.

Dagegen gelang es, alle Methojodide der Pyridincarbonsäurethioamide mit sehr guter Ausbeute aus den entsprechenden Methojodiden der Nitrile durch Umsetzen mit  $\text{H}_2\text{S}$  in wasserfreiem Pyridin mit Triäthanolamin als katalytischem Agens zu erhalten. Wichtig war, die Reaktionslösung nach Einleiten des Schwefelwasserstoffs nur kurze Zeit (ca. 3 h) stehen zu lassen und dann aufzuarbeiten. Da kein Phosphorpentaselenid zur Verfügung stand, versuchte ich auf dem letztgenannten Wege auch ein Selenonicotinamid-Methojodid zu gewinnen. Dies ist jedoch nicht gelungen.

Als mögliche Metaboliten der Thioamide interessierten die N-Oxide und S-Oxide dieser Verbindungen. Die S-Oxide des Thionicotinamids und des 6-Amino-thionicotinamids ließen sich nach der Methode von Walter und Curts darstellen. (135) Die Herstellung von Thionicotinamid-N-oxid war von Gardner, (136) Wenis und Lee 1957 beschrieben worden. Diese Autoren stellten aus Nicotinamid-N-oxid mittels Phosphoroxyltrichlorid das

3-Cyanopyridin-N-oxid her und setzten dieses mit  $H_2S$  zum Thionicotinamid-N-oxid um. In dieser Arbeit (J. Org. Chem. 22, 98, 1957) wurde für das 3-Cyanopyridin-N-oxid keine Elementaranalyse und kein Schmelzpunkt angegeben, für das Thionicotinamid-N-oxid wurde als einziges Element der Schwefel bestimmt. Es ist nicht gelungen, diese Synthese zu reproduzieren; das so gewonnene 3-Cyanopyridin-N-oxid enthielt z.B. nur 1,68 % Sauerstoff anstatt 13,32 %. Dieses "3-Cyanopyridin-N-oxid", das im IR-Spektrum eine  $C \equiv N$ -Valenzschwingung (bei  $2235\text{ cm}^{-1}$ ) zeigte, wurde mit  $H_2S$  in ammoniakalischem Äthanol umgesetzt. Das entstandene Produkt zeigte einen Schmelzpunkt von  $159 - 160^\circ C$  (Gardner et al. -  $161 - 164^\circ$ ). Die Elementaranalyse ergab hier für Sauerstoff einen Gehalt von 1,09 % anstatt von 10,38 %. Lediglich der Schwefelgehalt stimmte mit dem theoretischen ungefähr überein (gef. 19,54 % S; ber. 20,8 % S) und nur den Schwefelgehalt haben Gardner et al. angegeben. (136) Es sind erhebliche Zweifel anzumelden, ob die von diesen Autoren beschriebene Substanz tatsächlich Thionicotinamid-N-oxid darstellt.

Daraufhin wurde eine Methode zur Darstellung von 2-Fluoropyridin-N-oxid, die von D. Sarantakis et al. (1968) beschrieben wurde, auf das 3-Cyanopyridin übertragen. Die Oxidation (137) erfolgt in Methylenchlorid mit Trifluorperessigsäure. Das auf diesem Wege gewonnene Produkt war jedoch nicht einheitlich, was schon aus der Elementaranalyse hervorging, und stellt ein Gemisch aus 3-Cyanopyridin-N-oxid und Nicotinamid-N-oxid im ungefähren Verhältnis 6 : 4 dar, wie aus dem NMR-Spektrum hervorging. (Es gelang auch nicht, das 3-Cyanopyridin-N-oxid durch präparative Schicht-Chromatographie rein abzutrennen.) Dieser Teilerfolg könnte daran

liegen, daß Sarantakis et al. mit 85 %igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  gearbeitet haben, während mir nur 30 %iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Verfügung stand. Dieses Gemisch, das etwa 60 % 3-Cyanopyridin-N-oxid enthielt, wurde in wasserfreiem Pyridin in Gegenwart von Triäthylamin mit  $\text{H}_2\text{S}$  umgesetzt. Auf diesem Wege wurde ein Thionicotinamid-N-oxid erhalten, dessen Struktur durch Elementaranalyse und Massenspektroskopie gesichert wurde.

Die übrigen N-oxide wurden im Prinzip nach Taylor und Croveti (1954) bzw. Ochiai (1953, 1957) durch direkte Oxidation mit wässrigem Wasserstoffperoxid in Eisessig synthetisiert. (138, 139, 140, 148)

4. Anmerkungen zu den Infrarot-Spektren der Pyridincarbon-säurethioamide und -selenoamid.

(Zum Problem der Onamid/Olimid-Tautomerie)

---

In den vergangenen Jahren wurde mehrfach aus IR-Spektren von festen Pyridincarbonsäurethioamiden auf das Vorliegen einer Thionamid/Thiolimid-Tautomerie geschlossen.



In den Infrarotspektren einiger Nicotin- und Isonicotin-säurethioamide (44 , 141) ließ sich eine SH-Valenzschwingungsbande finden. Die IR-Spektren der festen Nicotinsäure- und Isonicotinsäurethioamide zeigen folgende Besonderheiten:

- 1.) Die Bande, die normalerweise der symmetrischen Valenzschwingung der Amino-Gruppe zugeordnet wird, ist stark verbreitert und nach kleineren Wellenzahlen verschoben. (142)
- 2.) In der Nähe von  $2600 \text{ cm}^{-1}$  tritt eine verhältnismäßig kleine Bande auf (sie ist beim Thionicotinamid jedoch stark ausgeprägt).
- 3.) Die der "Amid-II-Bande" der primären Amide entsprechende Bande (die Thioamid-A-Bande in der Klassifizierung von Jensen und Nielsen) ist nach höheren Wellenzahlen ( $1650 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ ) verschoben. (142)

Diese Befunde, besonders Punkt 2, haben zu der Annahme veranlaßt, daß die Thiolimid-Struktur vorliegt. In einer erst kürzlich erschienen Arbeit von Walter, Kubersky und Ahlquist (142) versuchen die Verfasser nachzuweisen, daß alle primären

Thioamide im festen Zustand ausschließlich in der Thionamid-Form vorliegen. Walter et al. ordnen die bei den Pyridincarbonsäurethioamiden auftretenden relativ schwachen Banden um  $2800$  und um  $2600\text{ cm}^{-1}$  Oberschwingungen zu. Als Grundfrequenzen könnten nach Walter Schwingungen bei  $1400$  und  $1300\text{ cm}^{-1}$  in Frage kommen.

Betrachtet man die IR-Spektren einiger Thioamide unter diesem Aspekt, so ergibt sich folgendes:

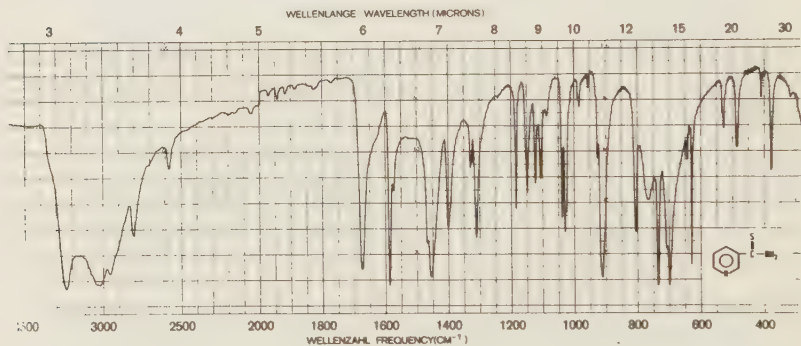


Abb. 23:

Im Spektrum des Thionicotinamids finden sich Banden bei  $2575\text{ cm}^{-1}$  (m) und bei  $2810\text{ cm}^{-1}$  (m), bei  $1403\text{ cm}^{-1}$  (s) und bei  $1312\text{ cm}^{-1}$  (s). Im Bereich zwischen  $1200$  und  $1300\text{ cm}^{-1}$  ist keine Absorptionsbande vorhanden.

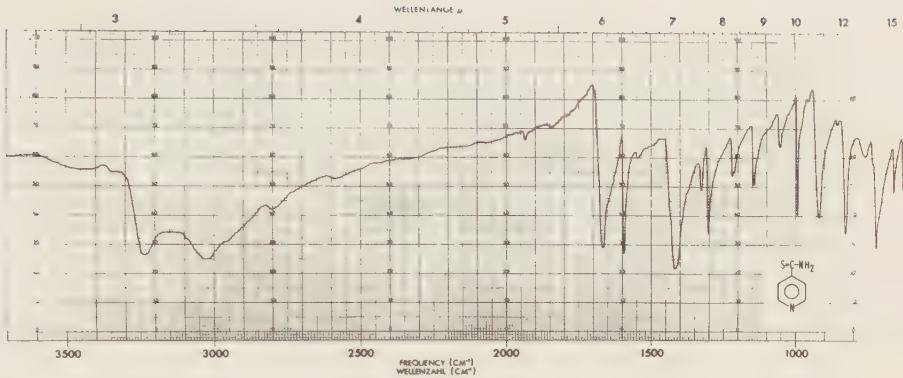


Abb. 24:

Im Spektrum des Isonicotinsäurethioamids finden sich  
u. a. folgende Banden:

2590  $\text{cm}^{-1}$  (w)

2800  $\text{cm}^{-1}$  (w)

1302  $\text{cm}^{-1}$  (s)

1420  $\text{cm}^{-1}$  (s, mit einer Schulter bei 1410  $\text{cm}^{-1}$ )

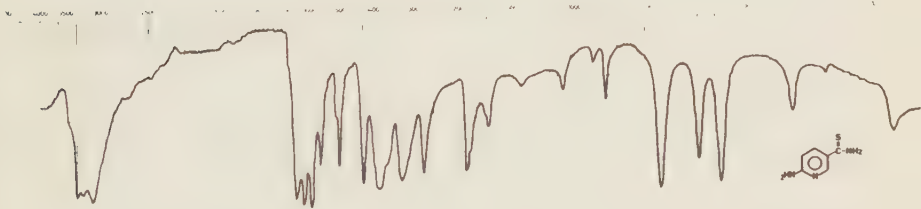


Abb. 25:

Im IR-Spektrum des 6-Amino-thionicotinamids

2755  $\text{cm}^{-1}$  (w; lediglich eine Andeutung)

1308  $\text{cm}^{-1}$  (s)

in diesem Spektrum ist im Bereich um 2600  $\text{cm}^{-1}$  und um  
1400  $\text{cm}^{-1}$  keine Schwingungsbande vorhanden,

In diesem Zusammenhang ist es nun sehr interessant, zum Vergleich mit den Thioamiden die Infrarotspektren von Selenoamiden heranzuziehen. Da wegen der größeren Masse des Selen die Schwingungsenergie verändert ist und damit die Lage der Se-H-Valenzschwingungen im Vergleich zu den S-H-Schwingungen stark nach kleineren Wellenzahlen verschoben wird, sind eher Aussagen über die Zuordnung von Banden im Bereich um  $2600\text{ cm}^{-1}$  möglich, sofern diese auch in den Spektren der Selenoamide auftreten sollten. Während die SH-Valenzschwingung im Bereich von  $2550 - 2600\text{ cm}^{-1}$  auftritt, ist nach den Untersuchungen von Harvey und Wilson (1966) am Methanselenol (143) bei ca.  $2268\text{ cm}^{-1}$  (Methanselenol fest bei  $-120^{\circ}\text{C}$ ) bis  $2330\text{ cm}^{-1}$  (Methanselenol-Dampf,  $25^{\circ}\text{C}$ ) eine Se-H-Streckschwingung zu erwarten. (vgl. auch 144,  $2250-2350\text{ cm}^{-1}$ ).

Untersucht man daraufhin die IR-Spektren des Selenonicotinamids und des Benzoessäureselenoamids, so ist weder beim einen noch beim anderen im Bereich zwischen  $2000$  und  $2500\text{ cm}^{-1}$  eine Bande zu sehen.

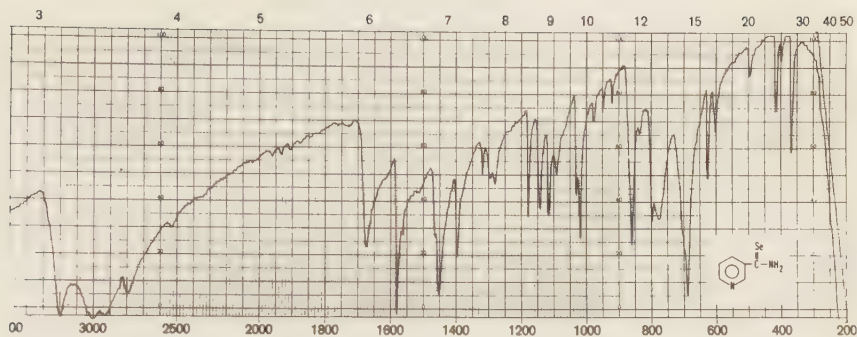


Abb. 26:

Im IR-Spektrum des Selenonicotinamids

2540  $\text{cm}^{-1}$  (w)

2800  $\text{cm}^{-1}$  (m)

1397  $\text{cm}^{-1}$  (s)

1280  $\text{cm}^{-1}$  (m)

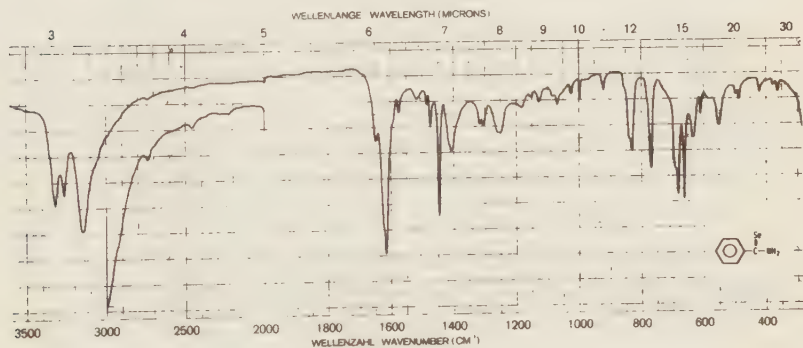


Abb. 27:

Im IR-Spektrum des Benzoesäureselenoamids

(Nach Ordinatenstreckung,  $F = 8,2$ ) (vgl. Abb. 28)

2740  $\text{cm}^{-1}$

nach Ordinatenstreckung (w)

2460  $\text{cm}^{-1}$

1315  $\text{cm}^{-1}$  (w)

relativ schwache Banden

1250  $\text{cm}^{-1}$  (w)

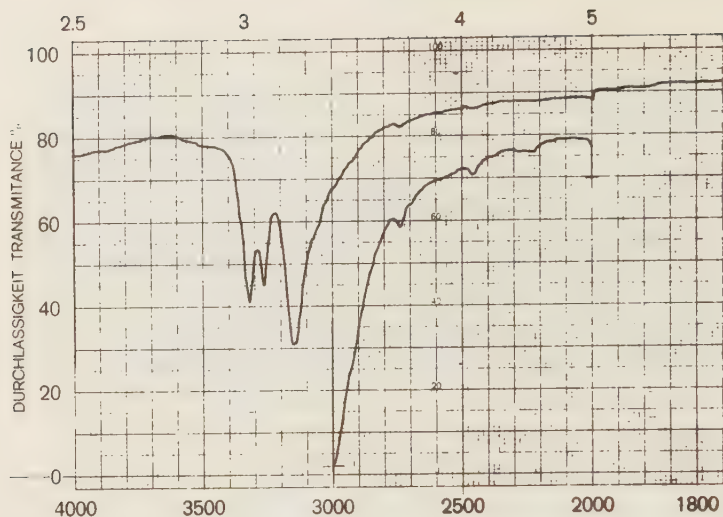


Abb. 28

In den Infrarotspektren der Carbonsäureselenoamide ist kein Anhaltspunkt für eine Se-H-Valenzschwingung zu finden. Dagegen treten auch in diesen Spektren schwache Banden um  $2800\text{ cm}^{-1}$  und um  $2500\text{ cm}^{-1}$  auf. Es liegt nun nahe, diese schwachen Banden, analog zu den in den IR-Spektren der Thioamide gefundenen, Oberschwingungen zuzuordnen.

In den IR-Spektren ist die Grundschiwingung in den einzelnen Fällen meist nicht exakt bei der halben Wellenzahl der Oberschwingung zu finden. Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich, da die Oberschwingungen oft nicht genau bei der doppelten (bzw. dreifachen, vierfachen usw.) Wellenzahl der Grundschiwingung erscheinen, sondern je nach der Größe der Anharmonizitätskonstanten der betreffenden Schwingung bei einer mehr oder weniger kleineren, (145)

Wenn das Selenonicotinamid in festem Zustand im Gleichgewicht mit der tautomeren Selenolimid-Form vorliegen würde, hätte im Bereich von  $2268$  bis  $2330\text{ cm}^{-1}$  eine Se-H-Valenzschwingung auftreten müssen. Dies ist nicht der Fall. Die schwachen Banden bei  $2540\text{ cm}^{-1}$  und  $2800\text{ cm}^{-1}$  können Grundschiwingungen mit einer Wellenzahl von  $1397\text{ cm}^{-1}$

und  $1280\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden. Da die Unterschiede in der Elektronegativität und im Atomradius zwischen Schwefel und Selen klein sind (Elektronegativität : 2.5 (S) und 2.4 (Se); Radien in Doppelbindung  $0.94\text{ \AA}$  (S) und  $1.07\text{ \AA}$  (Se) erscheint es eine Stützung der Ausführungen von Walter et al., daß die Bande bei  $2575\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum des Thionicotinamids keiner S-H-Valenzschwingung entspricht, sondern einer Oberschwingung zu einer Grundschiwingung bei  $1312\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden kann.

## Kapitel IV

### METHODEN

#### 1.) Darstellung der Aconitase aus Schweineherz

(EC 4.2.1.3 Citrate (isocitrate) hydro-lyase) modifiziert  
nach: G. Siebert, (61)

Ein frisches Schweineherz wird im Schlachthof sofort in Eis gelegt. Alle weiteren Arbeitsgänge erfolgen im Kälteraum bei  $+4^{\circ}\text{C}$  (z.B. Entfernung der großen Gefäße, des Fettes und Zerkleinerung). Das Gewebe wird mit der dreifachen Menge (V/W) eines 0.005 molaren Citrat-Puffers, pH 5.8, in einem Starmix homogenisiert; anschließend 15 Min. bei 14.000 U/min = 22.000 g zentrifugiert (Phywe) und der klare Überstand bei  $-5^{\circ}\text{C}$  (Alkoholbad) langsam unter Rühren mit Aceton versetzt (Endkonzentration 35 % Aceton (v/v) ). Die Suspension bleibt 15 - 20 Min. in der Kälte stehen, wird dann 15 Min. bei 22.000 g zentrifugiert und der klare Überstand bei  $-5^{\circ}\text{C}$  mit Aceton auf 45 % (v/v) gebracht. Nach ca. 20 Min. wird erneut bei ca. 20.000 g zentrifugiert (30 Min.), das Sediment zweimal in Aceton aufgeschlämmt und zentrifugiert. Zum Schluß wird es in getrocknetem Äther behandelt und der Rückstand schließlich in einem Vakuumexsiccator getrocknet. Von dem Pulver wird ein Teil in 2,5 ml Wasser oder Tris-Puffer (0,1 m; pH 7,4) mit Hilfe eines kleinen Glashomogenisators aufgeschlossen und die Suspension 10 Min. bei ca. 12.000 g (10.000 U/min, Rotor für kleine Becher) zentrifugiert. Der Überstand enthält Aconitase-Aktivität.

Die Lösung kann eingefroren werden, verliert jedoch sehr rasch an Aktivität (innerhalb von 1 - 2 Wochen 40 - 75 %).

Auf weitere Reinigung, z.B. über Sephadex G-100 (vgl. 149, B. Fansler and J.M. Lowenstein "Aconitase from Pig Heart" in Methods in Enzymology, Vol. XIII, p. 26 - 30, Academic Press New York and London, 1969, Eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan) wurde verzichtet,

#### Bestimmung der Aconitase-Aktivität

Meßküvette :        d = 1 cm, T = 25°C

|         |                                                                            |
|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1,0 ml  | Tris-Puffer (pH 7.4; 0,1 M)                                                |
| 0,2 ml  | Mg <sup>2+</sup> -Lösung (0,02 M)                                          |
| 0,1 ml  | NADP <sup>+</sup> -Lösung (12 mg NADP <sup>+</sup> in 3 ml<br>Tris-Puffer) |
| 0,01 ml | Isocitrat-Dehydrogenase                                                    |
| 0,1 ml  | Aconitase-Lösung                                                           |

---

ad 2,9 ml            mit aqua dest. auffüllen

Start der Reaktion durch Einmischen von 0,1 ml Citrat-Standardlösung.

Die Extinktionsveränderung wird bei 340 nm im Spektralphotometer verfolgt. Die Vergleichküvette enthält den gleichen Ansatz ohne Citrat.

#### 2.) Gewinnung cytoplasmatischer NADP<sup>+</sup>-abhängiger Oxidoreduktasen aus Rattenhirn (82, 150, 151)

---

Frisch entnommene Rattengehirne (Gewicht ca. 1,5 g) wurden bei einer Raumtemperatur von +4°C mit je 20 ml gekühlter 0,25 M Saccharose-Lösung im Potter-Elvehjem homogenisiert.

Danach wurde das Homogenat 1 Stunde bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge (Spinco) zentrifugiert. Das überstehende Cytoplasma wurde als Fermentpräparat in die optischen Tests eingesetzt (je nach Enzym 0,1 - 0,6 ml ad 3,0 ml). (siehe S. 122-125)

Eingesetzte Mengen bei den einzelnen Tests:

|                                |   |                         |
|--------------------------------|---|-------------------------|
| bei Glucose-6-phosphat-DH      | : | je 0,2 ml Cytoplasma    |
| bei der Isocitrat-DH           | : |                         |
| NADP <sup>+</sup> -Reihen      | : | 0,4 ml Cytoplasma       |
| Thio-NADP <sup>+</sup> -Reihen | : | 0,6 ml Cytoplasma       |
| bei der 6-Phospho-gluconat-DH  | : | 0,3 - 0,4 ml Cytoplasma |
| bei der Glutathion-Reduktase   | : | 0,5 ml Cytoplasma       |

3.) NAD(P)<sup>+</sup>-Abbau (Hydrolyse) durch die Glycohydrolase  
(EC 3.2.2.6) aus Hirnmikrosomen (152, 153, 154)

Die Glycohydrolase besitzt hydrolytische und transferierende Aktivität. Bei der Herstellung von NADP<sup>+</sup>-Analogen wurde vor allem die transferierende Aktivität ausgenutzt. So wie die transferierenden Eigenschaften bei der enzymatischen Synthese von NAD(P)<sup>+</sup>-Analogen in Abhängigkeit vom angebotenen heterocyclischen System sehr unterschiedlich sind, kann auch die hydrolytische Aktivität beim Abbau von NAD(P)<sup>+</sup>-Analogen stark variieren. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Hydrolyse und Transferierung ein. Dieser Aspekt ist vor allem interessant, wenn in vivo relativ hohe Anteile unphysiologischer Pyridinnucleotide gebildet werden und wenn über einen längeren Zeitraum (24 h) dieses hohe Niveau ge-

halten wird, wie es z. B. beim 6-Aminonicotinamid, 3-Acetylpyridin und Thionicotinamid beobachtet wird. In solchen Fällen ist zu klären, ob die Hydrolyse der  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge gegenüber den natürlichen Coenzymen verlangsamt ist.

Typische Inkubationsansätze zur Untersuchung des Abbaus von Thio- $\text{NAD(P)}^+$  wurden wie folgt durchgeführt:

Inkubationsansatz für  $\text{NADP}^+$ - (bzw. Thio- $\text{NADP}^+$ ) Abbau

|      |    |                                                                 |
|------|----|-----------------------------------------------------------------|
| 6    | mg | $\text{NADP}^+$ (Thio- $\text{NADP}^+$ )                        |
| 3,40 | ml | Phosphatpuffer (0.066 M; pH 7.4)                                |
| 2,60 | ml | Mikrosomensuspension ( $\pm$ 0,5 mg N pro ml Inkubationsansatz) |

Inkubation bei  $+37^\circ\text{C}$  im Wasserbad.

Inkubationsansatz für  $\text{NAD}^+$ - (bzw. Thio- $\text{NAD}^+$ ) Abbau

|      |    |                                                                 |
|------|----|-----------------------------------------------------------------|
| 6    | mg | $\text{NAD}^+$ (bzw. Thio- $\text{NAD}^+$ )                     |
| 4,94 | ml | Phosphatpuffer (0.066 M; pH 7.4)                                |
| 1,06 | ml | Mikrosomensuspension ( $\pm$ 0,2 mg N pro ml Inkubationsansatz) |

Inkubation bei  $+37^\circ\text{C}$  im Wasserbad.

Abnahme der Proben nach: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 Minuten.

Die Glycohydrolase (Mikrosomen) wird jeweils zuletzt zugesetzt. Proben zu 1,0 ml (0,95 ml) bzw. zu 0,5 ml werden zu den angegebenen Zeiten den Inkubationsansätzen entnommen und in Zentrifugengläser pipettiert. Das Eiweiß wird bei stabilen  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge durch Hitze (1 Min. in kochendem Wasser) denaturiert. Bei empfindlichen Analogen muß mit

Hilfe von  $\text{HClO}_4$  enteiweißt werden. Das denaturierte Protein wird abzentrifugiert und der Überstand wird zu den Messungen verwendet.

Der Gehalt des zu dem jeweiligen Zeitpunkt noch vorhandenen (nicht abgebauten)  $\text{NAD(P)}^+$  wird enzymatisch im optischen Test mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase- bzw. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion ermittelt (s. Methoden, Bestimmung von oxydierten Pyridin-nucleotiden).

Die auf diese Weise erhaltenen Werte werden graphisch dargestellt: Auf der Koordinate wird die Menge des nicht abgebauten  $\text{NAD(P)}^+$  in  $\mu\text{Mol}$  und auf der Abszisse die Zeit (in Minuten) aufgetragen, (vgl. Abb. 29)

Im Idealfall erhält man eine Gerade. Abgelesen wird der Restgehalt an  $\text{NAD(P)}^+$  nach 30 Min.. Die hydrolytische Aktivität der Mikrosomen gegenüber  $\text{NAD(P)}^+$  und ihren Analogen wird in  $\mu\text{Mol/mg Stickstoff/Std.}$  angegeben.

*Abbau von Thio- $\text{NAD}^+$  durch Rattengehirnmikrosomen*

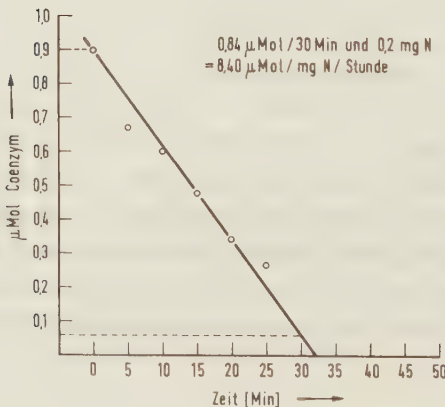


Abb. 29

#### 4.) Herstellung von Rattenmilzmikrosomen als Glycolhydro- lasequelle (EC 3.2.2.6)

---

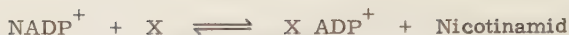
Die Mikrosomen wurden in Anlehnung an die Methode von Coper, Helge und Herken gewonnen. (155)

Ratten werden durch Dekapitieren getötet. Die Milzen werden sofort herauspräpariert, das Fettgewebe entfernt und die Organe in eiskalte Saccharose-Lösung (0,25 m) gegeben. Jeweils 2 - 3 Milzen werden mit einer Schere zerkleinert und in 20 ml eiskalte Saccharose-Lösung (0,25 m) homogenisiert (Plastikhomogenisator). Anschließend wird 10 Minuten bei ca. 11.000 - 12.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird in einer präparativen Ultrazentrifuge 1 Stunde lang bei 40.000 U/min  $\hat{=}$  100.000 g - 105.000 g zentrifugiert. Die Sedimente werden zweimal mit je 0,1 ml 0,25 m Saccharose-Lösung aufgerührt, die Suspensionen zusammengossen und nochmals kurz (nur einmal) im Glashomogenisator (Potter-Elvehjem) homogenisiert. Zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wurden 0,2 ml der Suspension mit konz. Schwefelsäure unter Zusatz von  $\text{SeO}_2$  verascht.

#### Herstellung von $\text{NADP}^+$ -Analogen mit Hilfe der Glycolhydro- lase (EC 3.2.2.6) aus Milzmikrosomen (68)

---

Es wurde im Prinzip nach einer "Standard-Methode" vorgefahren. Bei der Darstellung von  $\text{NADP}^+$ -Analogen wurden die besten Ausbeuten erzielt, wenn man in Phosphatpuffer ( $\frac{\text{m}}{15}$ , pH 6,6) arbeitete. Die Inkubationszeiten sind jedoch für die verschiedenen Pyridinderivate sehr unterschiedlich. In Vorversuchen wurde die jeweils optimale Inkubationszeit ermittelt. Das substituierte Pyridinderivat, das gegen Nicotinamid ausgetauscht werden sollte, wurde im Verhältnis zum  $\text{NADP}^+$  in einem 30- bis 60-fachen molaren Überschuß zugesetzt.



X = substituiertes Pyridin

XADP<sup>+</sup> = NADP<sup>+</sup>-Analogon

- a) Darstellung von 6-ANADP<sup>+</sup>
  - b) Darstellung von Thio-NADP<sup>+</sup>
  - c) Darstellung von Seleno-NADP<sup>+</sup>
  - d) Versuch der Darstellung von 6-Amino-Thio-NADP<sup>+</sup>
  - e) Darstellung von 3-Acetylpyridin-ADP<sup>+</sup>
  - f) Darstellung von Pyridin-3-carbaldehyd-ADP<sup>+</sup>
  - g) Darstellung von Isonicotinsäurethioamid-ADP<sup>+</sup>
- a) Herstellung von 6-Aminonicotinamid-adenindinucleotid-Phosphat (6-ANADP<sup>+</sup>)
- 

Inkubationsansatz:

100 mg NADP<sup>+</sup> (MG : 743,4) =  $1,14 \cdot 10^{-4}$  Mole

730 mg 6-Amino-nicotinsäureamid (MG : 137)

≙  $5,32 \cdot 10^{-3}$  Mole

65 ml m/15 Phosphatpuffer, pH 6.6

25 ml Rattenlebermikrosomen ≙ 27,0 mg Stickstoff

(≙ 0,3 mg N/ml Inkubationsansatz)

Inkubationszeit: 5 h bei +37° C

Aufarbeitung: Hitze-Fällung des Eiweißes (1 Minute bei 92°C Innentemperatur). Nach Zentrifugieren wurde der Überstand auf eine Säule (2,0 x 18 cm), gefüllt mit Dowex 1 x 10, (Formiat-Form) gegeben. Es wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis die Extinktion bei 260 nm gegen Null ging. Elution mit einem linearen Ameisensäuregradienten (Wasser + 4 n Ameisensäure).

Auffangen mittels eines Fraktionssammlers (Siphon: 4,0 ml). Im Eluat wurde die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 300 nm gemessen. Glas 101 bis 140 wurde gesammelt (182 ml) und gefriergetrocknet. Das 6-ANADP<sup>+</sup> wurde papierchromatographisch gereinigt.

Laufmittelgemisch: Isobuttersäure/Wasser/NH<sub>3</sub> (25 %) (66 : 33 : 1; v/v; pH 3.7). Die Banden wurden unter der UV-Lampe angezeichnet, ausgeschnitten und das 6-ANADP<sup>+</sup> mit Wasser absteigend eluiert. Die wässrige Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 1 - 2 ml eingengt. Das NADP<sup>+</sup>-Analoge wurde mit Äthanol abs. / Äther abs. (1 : 1, v/v) ausgefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals in abs. Äther aufgeschlämmt und nach Zentrifugation im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 25,9 mg 6-ANADP<sup>+</sup>  $\hat{=}$  26,4 % d. Theorie,  
bezogen auf NADP<sup>+</sup>

b) Herstellung von Thionicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat  
(Thio-NADP<sup>+</sup>)

---

Inkubationsansatz:

100 mg Thionicotinamid (MG: 138,2)  $\hat{=}$   $7,23 \cdot 10^{-4}$  Mole  
(unter Erwärmen und Rühren im Puffer lösen)

20 mg NADP<sup>+</sup> =  $2,28 \cdot 10^{-5}$  Mole

36 ml  $\frac{m}{15}$  Phosphatpuffer, pH 6.6

2,3 ml Rattenmilzmikrosomen ( $\hat{=}$  4,5 mg Stickstoff)  
( $\hat{=}$  0,11 mg/ml Inkubationsansatz)

Inkubationszeit: 2 Stunden bei  $+37^{\circ}\text{C}$

Aufarbeitung: Fällung des Eiweißes durch Ansäuern mit 3,5 ml 60 %iger  $\text{HClO}_4$  (p.A.), Endkonzentration im Inkubationsansatz an  $\text{HClO}_4$  ca. 5 %. Zentrifugation 15 Min. bei 14.000 g (Phywe,  $+4^{\circ}\text{C}$ ) in Kunststoffbechern. Anschließend Neutralisation am pH-Meter unter Eiskühlung mit 10 %iger KOH bis zu einem pH von 6.9. Das  $\text{KClO}_4$  wird in der Kälte ca. 15 Min. absitzen gelassen, dann wird der Überstand in der Phywe 15 Min. bei ca. 5.000 U/min  $\hat{=}$  2.800 g in Kunststoffbechern zentrifugiert. Die Lösung wird in einem Rundkolben gefriergetrocknet. Weitere Aufarbeitung wie unter Seleno-NADP<sup>+</sup> beschrieben. Eine Reinigung analog zum 6-ANADP<sup>+</sup> mit Hilfe von Dowex 1 x 10 und anschließender Papierchromatographie hat sich beim Thio-NADP<sup>+</sup> nicht bewährt.

c) Darstellung von Selenonicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (Seleno-NADP<sup>+</sup>)

Inkubationsansatz:

|      |    |                                                           |           |                      |      |
|------|----|-----------------------------------------------------------|-----------|----------------------|------|
| 117  | mg | Selenonicotinamid (MG: 185)                               | $\hat{=}$ | $6,35 \cdot 10^{-4}$ | Mole |
| 21   | mg | NADP <sup>+</sup> (85 %ig; MG: 743,4)                     | $\hat{=}$ | $2,4 \cdot 10^{-5}$  | Mole |
| 36,0 | ml | $\frac{\text{m}}{15}$ Phosphatpuffer, pH 6.6              |           |                      |      |
| X    | ml | Rattenmilzmikrosomen (ca. 0,12 mg N/ml Inkubationsansatz) |           |                      |      |

Inkubationszeit: 45 Minuten bei  $+37^{\circ}\text{C}$

Aufarbeitung: Das Selenonicotinamid wird unter Rühren (Magnetrührer) und unter vorsichtigem Erwärmen (bis maximal  $50^{\circ}\text{C}$ ) im Phosphatpuffer gelöst. Vom ungelösten wird abfiltriert. Danach wird das  $\text{NADP}^{+}$  sowie die berechnete Menge an Mikrosomen zugegeben und das Reaktionsgemisch umgeschwenkt. Der Inkubationsansatz wird im Thermostaten bei  $37^{\circ}\text{C}$  45 Minuten inkubiert. Das Reaktionsgefäß (ein 100 ml Erlenmeyerkolben) wird alle 5 - 10 Minuten zur Durchmischung des Ansatzes umgeschwenkt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zupipettieren von 3,5 ml 60 %iger  $\text{HClO}_4$  (p. A.) gestoppt. (Die Endkonzentration an  $\text{HClO}_4$  im Inkubationsansatz soll etwa 5 % sein.) Anschließend wird die Lösung zur Entfernung des denaturierten Eiweißes 15 Minuten lang bei 14.000 g in Kunststoffröhrchen zentrifugiert ( bei  $+4^{\circ}\text{C}$  ).

Der orange gefärbte Überstand wird am pH-Meter unter Eiskühlung und unter Rühren mit 10 %iger KOH vorsichtig auf einen pH-Wert von 6,9 eingestellt. Kurz vor Erreichen des Neutralpunktes schlägt die Farbe der Lösung nach gelb um. Man läßt das  $\text{KClO}_4$  im Eisbad ca. 15 Minuten absitzen, dekantiert vorsichtig und zentrifugiert die Lösung erneut 15 Minuten lang bei 5.000 U/min  $\hat{=}$  2.800 g und  $4^{\circ}\text{C}$  im Kunststoffröhrchen. Der Überstand wird in einem 250 ml-Rundkolben gefriergetrocknet. Danach wird der Rückstand - ein intensiv orange-gelbes lockeres Pulver - in zwei große Zentrifugengläser ( $v = 80\text{ ml}$ ) überführt. Das überschüssige Selenonicotinamid wird dreimal mit je 20 - 30 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Der Niederschlag wird in eine Porzellanschale gebracht und im Vacuum-Exsiccator getrocknet.

Das orange gefärbte trockene Pulver wird in wenig destilliertem Wasser (ca. 5 ml) aufgenommen, kurze Zeit mit einem Glasstab gerührt und anschließend 3 - 5 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Niederschlag ist weiß und besteht hauptsächlich aus nicht gelöstem  $\text{KClO}_4$  und anorganischem Phosphat.

Zur weiteren Entsalzung und zur vollständigen Abtrennung des restlichen nicht extrahierten Selenonicotinamids wird die wässrige Lösung auf eine mit Sephadex G-10 beschickte Säule gegeben und bei  $0^\circ \text{C}$  mit Wasser eluiert (Säule  $\varnothing$  2 cm; 30 g Sephadex G-10 in dest. Wasser gequollen). Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen zu 4,5 ml gesammelt. Die Gläser werden sofort in ein Eisbad gestellt und mit Hilfe eines Spektralphotometers die UV-Spektren geschrieben.

Das Seleno- $\text{NADP}^+$  erscheint in den Gläsern 5 - 13. Diese Fraktion wird zusammengegossen, enzymatisch der Gehalt an Seleno- $\text{NADP}^+$  bestimmt und anschließend gefriergetrocknet. Das so gewonnene Seleno- $\text{NADP}^+$  ist zwar sehr rein, es enthält aber noch eine geringe Menge an Spaltprodukten, was bei der Dünnschicht-Chromatographie an DEAE-Cellulose zu sehen war.

Zur weiteren Reinigung wird das Seleno- $\text{NADP}^+$  erneut der Säulenchromatographie unterworfen und zwar an Sephadex G-25 (25 g Sephadex G-25 gequollen in Wasser, Säule  $\varnothing$  2 cm; Temperatur  $0^\circ \text{C}$ ). Als Eluationsmittel dient auch hier dest. Wasser. Das Seleno- $\text{NADP}^+$  erscheint etwa bei Glas 12 - 16.

d) Versuch der Herstellung von 6-Aminothionicotinamid-  
adenin-dinucleotid-phosphat (6-Amino-Thio-NADP<sup>+</sup>)

---

Inkubationsansatz:

20 mg NADP<sup>+</sup> =  $2,28 \cdot 10^{-5}$  Mole  
100 mg 6-Aminothionicotinamid (MG: 153,21)  $\hat{=}$   $6,52 \cdot 10^{-4}$  Mole  
(unter Erwärmen und Rühren im Puffer lösen)  
36 ml  $\frac{m}{15}$  Phosphatpuffer, pH 6,6  
2,3 ml Rattenmilzmikrosomen ( $\hat{=}$  4,5 mg N  $\hat{=}$  0,11 mg N/ml  
Inkubationsansatz)

Inkubationszeit: 5 h, 4 h bei +37° C

Die Aufarbeitung wurde teils wie unter 6-ANADP<sup>+</sup> beschrieben,  
teils wie unter Thio-NADP<sup>+</sup> beschrieben durchgeführt. Unter  
den gewählten Bedingungen wurde kein NADP<sup>+</sup>-Analoges des  
6-Aminothionicotinamids gebildet.

e) Herstellung des 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-  
phosphat (3-AcPyrADP<sup>+</sup>)

---

Inkubationsansatz:

20 mg NADP<sup>+</sup> =  $2,28 \cdot 10^{-5}$  Mole  
0,121 ml 3-Acetylpyridin (MG: 121,14; spez. Gewicht:  
 $1,10 \frac{g}{ml}$ ) ( $\hat{=}$  0,133 g) =  $1,09 \cdot 10^{-3}$  Mole  
0,364 ml Rattenmilzmikrosomen ( $\hat{=}$  1,2 mg N oder  
ca. 0,12 mg N/ml Inkubationsansatz)  
10 ml  $\frac{m}{15}$  Phosphatpuffer, pH 6,6

Inkubationszeit: 60 Minuten bei +37° C

Aufarbeitung: Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,972 ml 60 %iger  $\text{HClO}_4$  gestoppt (Endkonzentration im Inkubationsansatz an  $\text{HClO}_4$  ca. 5 %). Weitere Reinigung analog zu der beim Seleno-NADP<sup>+</sup> beschrieben.

f) Darstellung des Pyridin-3-carbaldehyd-adenin-dinucleotid-phosphat (3-OHCPyrADP<sup>+</sup>)

---

Inkubationsansatz:

20 mg NADP<sup>+</sup>  $\hat{=}$   $2,28 \cdot 10^{-5}$  Mole  
0,13 ml Pyridin-3-carbaldehyd (MG: 107,11; spez. Gewicht:  $1,14 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$ ) ( $\hat{=}$  0,15 g)  $\hat{=}$   $1,4 \cdot 10^{-3}$  Mole  
10,0 ml  $\frac{\text{m}}{15}$  Phosphatpuffer, pH 6.6  
0,156 ml Rattenmilzmikrosomen

Inkubationszeit: 60 Minuten bei +37° C

Aufarbeitung: Die Reaktion wird durch Zupipettieren von 0,97 ml 60 %iger  $\text{HClO}_4$  gestoppt (Konzentration an  $\text{HClO}_4$  im Inkubationsansatz ca. 5 %). Aufarbeitung wie unter Seleno-NADP<sup>+</sup> beschrieben. Säulenchromatographie über Sephadex G-10 und anschließend über Sephadex G-25.

g) Darstellung von Isonicotinsäurethioamid-adenin-dinucleotid-phosphat (Isothio-NADP<sup>+</sup>)

---

Inkubationsansatz:

100 mg Isonicotinsäurethioamid (MG: 138,20)  
 $\hat{=}$   $7,23 \cdot 10^{-4}$  Mole (unter Erwärmen und Rühren im Puffer lösen)  
20 mg NADP<sup>+</sup>  $\hat{=}$   $2,28 \cdot 10^{-5}$  Mole  
36 ml  $\frac{\text{m}}{15}$  Phosphatpuffer, pH 6.6  
0,56 ml Rattenmilzmikrosomen ( $\hat{=}$  0,11 mg N/ml Inkubationsansatz)

Inkubationszeit: 110 Minuten bei  $+37^{\circ}$  C (im Wasserbad)

Aufarbeitung: 100 mg Isonicotinsäurethioamid lösen sich nicht vollständig in 36 ml Puffer (Rühren und Erhitzen auf ca.  $50^{\circ}$  C). Es wurde jedoch kein weiterer Puffer zugegeben, sondern nach Zusatz von  $\text{NADP}^{+}$  und Mikrosomen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 3,34 ml 60 %ige  $\text{HClO}_4$  gestoppt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu der Thio- $\text{NADP}^{+}$ -Darstellung.

Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie zunächst an Sephadex G-10 (30 g; Säule  $\varnothing$  2 cm; Füllhöhe 22,5 cm) und anschließend an Sephadex G-25 (20 g). Nach Gefriertrocknung bleibt ein gelbliches Pulver zurück.

Das Produkt ist frei von  $\text{NADP}^{+}$ , was ein Hydrierungsversuch mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Papierchromatographie ergab.

Papierchromatographie im Fließmittelsystem Isobuttersäure/konz. Ammoniak/Wasser (66 : 1 : 33), pH 3.7.

Laufzeit: 3 h 15 min

Laufstrecke: 12,8 cm (von der Auftraglinie bis zur Lösungsmittelfront)

in einer Chromatographiekammer (Desaga) für die DC.

$\text{NADP}^{+}$  -  $R_F$  0.26

Isothio- $\text{NADP}^{+}$  -  $R_F$  0.35

Es ist eine geringe Verunreinigung mit einem  $R_F$ -Wert von ca. 0.19 und eine im UV kaum noch wahrnehmbare mit einem  $R_F$ -Wert von ca. 0.46.

Das UV-Spektrum des ox. Isonicotinsäurethioamid- $\text{ADP}^{+}$  hat eine gewisse Ähnlichkeit mit demjenigen des Seleno- $\text{NADP}^{+}$ .

Neben einem Hauptmaximum bei 256,5 nm ist noch ein kleines Absorptionsmaximum bei 338 nm zu sehen. Isothio-NADP<sup>+</sup> ist jedoch enzymatisch nicht hydrierbar und bildet auch erwartungsgemäß keinen Cyanid-Komplex. Mit NaBH<sub>4</sub> ist im Differenzspektrum eine Absorptionsbande bei 293 nm zu sehen. Auch die Modell-Substanz, das Isonicotinsäurethioamid-Methojodid zeigt nach Behandlung mit NaBH<sub>4</sub> eine neue Bande bei 285 nm (s. auch Abschnitt "Coenzym-Modell-Substanzen" S. 69 ).

## 5.) Säulenchromatographie

### a) Ionenaustauschchromatographie

Es sind viele Verfahren für die Trennung von Nucleotiden durch Ionenaustausch-Chromatographie beschrieben worden. (156) Das Trägermaterial, welches für diese Trennung benutzt wurde, reicht von Ionen-Austauschern auf Polystyrol-Basis (vgl. z.B. die Verfahren, welche von Hurlbert et al., Anderson et al., Ingle und Koransky beschrieben wurden) (156-162) über DEAE-Cellulose, TEAE-Cellulose, ECTEOLA-Cellulose und PEI-Cellulose bis zu DEAE-Sephadex. Die meisten der publizierten Verfahren besitzen gewisse Nachteile. Zum Beispiel schließen die meisten Methoden, welche sich der Polystyrol-Ionenaustauscher bedienen, die Verwendung von sauren Elutionsmitteln ein, wodurch säurelabile Verbindungen während der Chromatographie zerstört werden können.

### aa) Dowex-Ionenaustauscher

Eine gute Auftrennung der oxydierten Pyridinnucleotide wird mit Hilfe des stark basischen Anionenaustauschers Dowex 1 x 10,

Formiatform erreicht (Säule 2 x 15 cm). Es wird eine Gradientenelution durchgeführt, die auf einer kontinuierlichen linearen Veränderung des pH-Wertes beruht (4 n Ameisensäure wird in einen mit Wasser beschickten Mischer gedrückt). Der Nachteil der Methode für empfindliche Nucleotide ist neben der Verwendung von Säure die lange Verweildauer (ca. 24 Stunden) des Nucleotids auf der Säule.

#### b) Gelchromatographie (Sephadex)

Bei diesen chromatographischen Verfahren werden Unterschiede in den Molekülgrößen zur Trennung ausgenutzt. Die Stofftrennung mittels der Gelfiltration ist im Prinzip nichts anderes als die Ausnutzung der Möglichkeit bzw. Unmöglichkeit der Teilchendiffusion in die gequollenen Sephadex-Körner. (163)

Der Effekt wird vor allem bei der Gewinnung der reduzierten Formen der Pyridinnucleotide ausgenutzt, in dem mittels Sephadex G-25 die zur Hydrierung verwendete Dehydrogenase, z.B. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe (MG: 128 000) abgetrennt wurde.

Bei niedermolekularen Substanzen beobachtet man gelegentlich ein von der Theorie der Gelfiltration abweichendes Verhalten. Diese sekundären Effekte beruhen zum Teil auf einer Adsorption, die durch die Struktur der Substanz bedingt ist. Hierunter fallen viele aromatische und heterocyclische Verbindungen. In diesen Fällen erfolgt die Elution sehr viel später als aufgrund des Molekulargewichtes zu erwarten wäre. (164)

Diese Effekte, die besonders ausgeprägt bei den Gelen mit dem höchsten Vernetzungsgrad (Sephadex G-10 und G-15) sind, wurden ausgenutzt, um die auf enzymatischem Wege

synthetisierten  $\text{NADP}^+$ -Analogen vollständig von den unphysiologischen Pyridinderivaten wie Selenonicotinamid, Thionicotinamid, 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-carbaldehyd zu reinigen, (165)

#### 6.) Papierchromatographie der Pyridinnucleotide

Zur analytischen Reinheitskontrolle und zur Reinigung im präparativen Maßstab von sehr stabilen  $\text{NADP}^+$ -Analogen, z.B. dem 6-ANADP<sup>+</sup>, wurde die Papierchromatographie herangezogen. (11, 68, 166 - 170)

Als Papier wurde Whatman No. 1 (30 x 32 cm) verwendet. Die im Wasser gelösten Nucleotide wurden auf einer Startlinie aufgetragen, die etwa 3 cm vom mittleren Rand entfernt war. Um eine befriedigende Trennung zu erhalten, erwies es sich als zweckmäßig, auf einem Zentimeter Startlinie nicht mehr aufzutragen, als einer Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht. Das beladene Papier wurde in Form einer Rolle zusammengeklammert. Als Chromatographiegefäß diente eine zylindrische Glasglocke. Es wurde aufsteigend eindimensional chromatographiert.

Normalerweise wurde das Chromatogramm nur einmal in einem der unten genannten Laufmittelsysteme bei Zimmertemperatur entwickelt. Die Laufzeit betrug ca. 16 Stunden. Das Papier wurde an der Luft getrocknet und die einzelnen Komponenten unter UV-Licht (Wellenlängen: 254 und 366 nm) mit Bleistift angezeichnet.

#### Laufmittelsysteme

Isobuttersäure/konz. Ammoniak/Wasser

|    |    |     |                 |
|----|----|-----|-----------------|
| a) | 66 | 1   | 33 (V/V) pH 3.7 |
| b) | 66 | 1,7 | 33 (V/V) pH 3.8 |
| c) | 57 | 4   | 39 (V/V) pH 4.3 |

Äthanol (95 %ig) / 1.0 M Ammoniumacetat

|    |   |   |              |
|----|---|---|--------------|
| a) | 7 | 3 | (V/V) pH 7.5 |
| b) | 7 | 3 | (V/V) pH 5.0 |

Man löst 77 g Ammoniumacetat in ungefähr 750 ml Wasser und stellt den pH im ersten Fall mit Ammoniak, im zweiten Fall mit Eisessig auf den gewünschten Wert ein und füllt auf 1 Liter auf.

Isobuttersäure/konz. Ammoniak/Wasser/Äthanol (66 : 1 : 30 : 4)  
Zur Trennung von Thio-NAD(P)<sup>+</sup> von NAD(P)<sup>+</sup>.

#### Zur Identifizierung von Hydrolyseprodukten

n-Butanol/Äthanol/konz. Ammoniak/Wasser (110 : 10 : 20 : 10)

In diesem System erfolgt eine gute Trennung von Adenin, Nicotinamid, Thionicotinamid.

n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (60 : 30 : 10 ; V/V)

Laufzeit: 14 - 16 h

Zur Dokumentation der Ergebnisse der Papierchromatographie wurden die im UV-Licht absorbierenden Flecken und Banden nach dem Photoprintverfahren photographiert.

Bei der Papierchromatographie im präparativen Maßstab wurden die angezeichneten Banden ausgeschnitten, noch anhaftende Spuren von Isobuttersäure mit Aceton und Äthanol ausgewaschen und die Nucleotide in einer geschlossenen Kammer mit Wasser von den Papierstreifen absteigend eluiert (vgl. Keil-Šormova, Laboratoriumstechnik für Biochemiker, Akademische Verlagsanstalt Leipzig, 1965, S. 137).

Aus dem Eluat werden die Pyridinnucleotide entweder ausgefällt mit Äthanol abs. / Äther abs. (1 : 1) bzw. Aceton oder das Eluat wird im Exsiccator oder an der Gefrier-trocknungsanlage zur Trockne eingeädmpft.

#### 7.) Dünnschichtchromatographie der Pyridinnucleotide

Für analytische Fragen besitzt die Dünnschichtchromatographie (171) von Pyridinnucleotiden an DEAE-Cellulose große Vorteile (172) gegenüber der Papierchromatographie. Bemerkenswert ist vor allem die sehr kurze Laufzeit (60 Minuten gegenüber 16 Stunden) bei gleichwertiger Trennung und die damit verbundene kurze Verweildauer der Nucleotide auf dem Sorptionsmaterial. Empfindliche Pyridinnucleotide wie Thio-NADP<sup>+</sup> oder Seleno-NADP<sup>+</sup> werden bei der Papierchromatographie ganz oder teilweise zerstört.

Sorptionsmittel: Nucleotid-Coenzyme können an Schichten aus Kieselgel G, Cellulose und an Ionenaustauschern wie DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex, ECTEOLA-Cellulose und PEI-Cellulose getrennt werden.

Fließmittel: Viele der verwendeten Fließmittel sind aus der Papierchromatographie entlehnt.

#### Für Kieselgel G-Schichten

- a) Isobuttersäure / konz. Ammoniak / Wasser (66 : 1 : 33)
- b) n-Butanol / Aceton / Eisessig / 5 %ige NH<sub>3</sub>-Lösung / H<sub>2</sub>O (35 : 25 : 15 : 15 : 10)

Die Laufzeit beträgt etwa 5 Stunden. Die Trennleistungen für NADP<sup>+</sup>-Analoge der Kieselgel-Schichten sind nicht sehr

überzeugend. Deshalb wurde hauptsächlich auf Cellulose- und DEAE-Cellulose-Schichten chromatographiert.

Für Cellulose-Schichten (ohne Gips-Zusatz)

- a) Isobuttersäure / konz. Ammoniak / Wasser (66 : 1 : 33)

Laufzeit: ca. 5 Stunden

- b) tert. Amylalkohol / Ameisensäure / Wasser (30 : 20 : 10)

Laufzeit: ca. 120 Minuten

- c) n-Butanol / Aceton / Eisessig / 5 %ige  $\text{NH}_3$ -Lösung / Wasser (45 : 15 : 10 : 10 : 20)

Für DEAE-Cellulose-Schichten (172)

Diphosphate mit 0,02 n - 0,03 n HCl; Triphosphate mit 0,04 n HCl, z.B. zur Trennung  $\text{NADP}^+$ /Seleno- $\text{NADP}^+$ .

Laufzeit: 40 - 60 Minuten

An Ionenaustauscher-Schichten chromatographiert man aufsteigend in offenen Gefäßen. Nach dem Trocknen wurden die Platten einmal in 0,01 n - 0,03 n HCl leer entwickelt. Die Substanzen wurden 3,0 cm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen. Die beladene Platte wurde in 0,04 n HCl laufen gelassen. (Nach 60 Minuten wurde sie herausgenommen. Laufstrecke Start - Front: 10,7 - 11,5 cm) und mit Hilfe eines Föhns getrocknet. Unter der UV-Lampe wurden die Banden angezeichnet. Die Banden wurden abgeschabt und die  $\text{NADP}^+$ -Analoge aus der DEAE-Cellulose mit je 2,5 ml 0,2 n HCl durch mechanisches Schütteln im Zentrifugenglas extrahiert.

### Herstellung der Schichten:

Zum Bestreichen von je 5 Platten (20 x 20 cm), Schichtdicke 0,25 mm, wurden die angegebenen Mengen an Sorptionsmittel und Wasser etwa eine Minute in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben kräftig geschüttelt und die Suspension in üblicher Weise (Desaga-Streichgerät) auf die Glasplatten ausgebreitet. Die Schichten wurden über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Kieselgel G : 30 g Sorptionsmittel + 60 ml dest. Wasser  
(schnell arbeiten, Abbindezeit 2 - 4 Min.)

Kieselgel H, : 30 g Sorptionsmittel + 65 - 70 ml dest.  
HF<sub>234</sub> Wasser

Cellulose und : 10 g Sorptionsmittel + 60 - 70 ml  
Cellulose-Ionen- dest. Wasser  
austauscher (DEAE)

Nicht modifizierte Cellulose wird am besten mit Hilfe eines Mixers (Ultra Turrax) 2 - 3 Minuten lang homogenisiert.

### 8.) Hochspannungselektrophorese (91, 173 - 175)

Bei manchen analytischen Fragestellungen nach der Reinheit der NADP<sup>+</sup>-Analoge hat sich die Hochspannungselektrophorese auf Papier als vorteilhaft erwiesen.

Vor der Papierchromatographie hat sie vor allem wesentlich kürzere Laufzeiten voraus (120 - 200 Min.).

Verwendet wurden als Träger:

- a) Papier MN 214 (Macherey und Nagel, Düren)
- b) " SS 2043 b (C. Schleicher und Schüll,  
Dassel, Krs. Einbeck)
- c) " Wh 1 (Whatman-Papier, durch Firma  
Hormuth u. Vetter, Heidelberg)

Bewährt haben sich folgende Puffer zur Elektrophorese der Pyridinnucleotide:

- a) Citronensäure (0,05 M/l) - NaOH-Puffer, pH 4,6  
bzw. 5,2
- b) Pyridin-Acetat-Puffer, pH 5,2 - 5,3  
(10 ml Pyridin - destilliert - + 4 ml Eisessig + Wasser  
ad 1.000 ml).

Der letztgenannte Puffer besitzt den großen Vorteil, daß er mit Aceton aus dem Papier vollständig ausgewaschen werden kann.

Gearbeitet wurde bei einem Spannungsabfall von 20 V/cm bis 40 V/cm mit einer im Institut selbstgefertigten Apparatur, die im Prinzip derjenigen von Wieland und Pfeleiderer (vgl. Clotten/Clotten S. 25) entsprach.

## 9.) Identifizierung der Nucleotide

### a) Aufzeichnung der UV-Spektren

Von den gewonnenen reinen Substanzen wurden die UV-Spektren meist in dem Wellenlängenbereich von 200 - 500 nm mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman, Modell DK 2, aufgenommen. Neben den Spektren der reduzierten Formen - nach enzymatischer bzw. chemischer Hydrierung ( $\text{NaBH}_4$ , Natriumdithionit) - herangezogen. Außerdem wurde die nucleophile Addition des Cyanidions (in 0,1 M KCN-Lösung) an die  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge zur Identifizierung und Charakterisierung verwertet. Bei  $\text{NADP}^+$ -Analoge, von denen schon entsprechende  $\text{NAD}^+$ -Verbindungen beschrieben worden sind, wurden vor allem deren Spektren zum Vergleich herangezogen.

## b) Phosphat- und Ribose-Bestimmungen

### ba) Kolorimetrische Bestimmung des Phosphatanteils

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes der zu analysierenden Verbindungen wurde nach der Methode von Berenblum und Chain durchgeführt, (176)

Das Verfahren basiert auf der vollständigen Extrahierbarkeit der Phosphormolybdänsäure mit Isobutanol.

Zunächst wird der organisch gebundene Phosphor in die anorganische Form durch Veraschen mit 1 ml 70 %iger Perchlorsäure bei 180° C überführt. Das klare farblose Veraschungsprodukt wird dann in einen kleinen Scheidetrichter gespült und nach Zugabe von 2,5 ml 5 %iger Ammoniummolybdatlösung mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und mit 10 ml Isobutanol versetzt.

Nach 2 Minuten langem Schütteln wird die wässrige Phase abgelassen, und die das Phosphat enthaltende zurückbleibende alkoholische Phase 2mal mit je 5 ml 1 n Schwefelsäure gewaschen.

Schließlich wird durch 30 Sekunden langes Schütteln mit 15 ml verdünnter Zinn-2-chloridlösung die Phosphormolybdänsäure zu einer blauen Komplexverbindung reduziert.

Die zu jeder Bestimmung frisch mit konzentrierter Salzsäure bereitete 40 %ige Zinn-2-chloridlösung ist mit 1 n Schwefelsäure im Verhältnis 1 : 200 verdünnt.

Die wässrige Phase wird erneut abgelassen und die blaugefärbten Lösungen quantitativ in Meßkolben mit Äthanol gespült und mit Äthanol auf 25 ml aufgefüllt.

Als Eichwert diene eine Lösung von primärem Kaliumphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) mit einem Phosphatgehalt von 1  $\mu\text{Mol/ml}$ . Die Extinktion der Lösungen wurde in einem Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, bei 725 m $\mu$  gemessen. (vgl. Tab. 13)

bb) Kolorimetrische Bestimmung des Riboseanteils (177 - 179)

Die Ribose-Bestimmung erfolgte nach der von Mejbaum (177) angegebenen und von Barnum und Mitarbeitern modifizierten Methode. Dazu benötigt man eine Orcinlösung folgender Zusammensetzung:

0,4 g Orcin

1,0 ml Eisentrichlorid-Lösung (4 %ig in 36 %iger HCl)  
Salzsäure ad 100 (36 %ig)

1 ml der Ribose enthaltenden Lösung und 2 ml des Orcin-Reagenz wurden 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, wobei sich die Lösung bei Anwesenheit von Ribose grün verfärbt.

Die Intensität der grünen Farbe wurde nach dem Abkühlen der Lösung bei einer Wellenlänge von  $668\text{ m}\mu$  gegen einen Leerwert (Wasser) in einem Beckman-Spektrophotometer gemessen.

Als Eichwert dienten zwei Lösungen mit je einer definierten Menge von  $\text{NAD(P)}^+$  und AMP, deren spezifische Extinktion bei einer Wellenlänge von  $260\text{ m}\mu$  bekannt ist. (vgl. Tab. 12).

Tabelle 12

Ribosegehalt von Pyridinnucleotiden

| $E_{260} = 1,0$          | $E_{668} \text{ nm}$ | Mol                  | Mol bezogen<br>auf AMP      | Mol bezogen<br>auf NAD <sup>+</sup> |
|--------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| AMP                      | 0.651                | $7 \cdot 10^{-8}$    |                             |                                     |
| NAD <sup>+</sup>         | 0.887                | $11,1 \cdot 10^{-8}$ |                             |                                     |
| NADP <sup>+</sup>        | 0.898                | $12,2 \cdot 10^{-8}$ |                             |                                     |
| Seleno-NADP <sup>+</sup> | $0.868 \pm 68$       |                      | $9,3 \cdot 10^{-8} \pm 0,7$ | $10,85 \cdot 10^{-8} \pm 0,85$      |

Tabelle 13

Phosphatgehalt

| $E_{260 \text{ nm}} = 1,0$                               | $E_{725 \text{ nm}}$ | Mole Phosphat        |
|----------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| AMP                                                      | 0,073                | $8,37 \cdot 10^{-8}$ |
| $\text{NAD}^+$                                           | 0,134                | $15,3 \cdot 10^{-8}$ |
| $\text{NADP}^+$                                          | 0,146                | $16,7 \cdot 10^{-8}$ |
| Seleno- $\text{NADP}^+$                                  | 0,160                | $18,2 \cdot 10^{-8}$ |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>(1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) | $0,872 \pm 17$       | $10^{-6}$            |

Tabelle 14

|                  | Mole bezogen auf $E_{260}$ | Ribose bezogen auf $NAD^+$ | Phosphat             | $E_{260}$ : Ribose : Phosphat |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------------|
| AMF              | $7,0 \cdot 10^{-8}$        | $7 \cdot 10^{-8}$          | $8,37 \cdot 10^{-8}$ | 1 : 1 : 1,19                  |
| $NAD^+$          | $5,6 \cdot 10^{-8}$        | $11,1 \cdot 10^{-8}$       | $15,3 \cdot 10^{-8}$ | 1 : 2 : 2,7                   |
| $NADP^+$         | $5,6 \cdot 10^{-8}$        | $11,2 \cdot 10^{-8}$       | $16,7 \cdot 10^{-8}$ | 1 : 2 : 3                     |
| Seleno- $NADP^+$ | $5,4 \cdot 10^{-8}$        | $10,85 \cdot 10^{-8}$      | $18,2 \cdot 10^{-8}$ | 1 : 2 : 3,3                   |

Auf diese Weise wurde bestimmt, daß das Seleno- $NADP^+$  2.0 Mole Ribose und

3.3 Mole Phosphat pro Mol Adenin enthält.

### c) Hydrolyse der $\text{NAD(P)}^+$ -Analogen

#### ca) Saure Hydrolyse

Die auf enzymatischem Wege hergestellten  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge wurden hydrolysiert und das Hydrolysat aufgetrennt und mit Hilfe von Referenzsubstanzen die Identität der eingebauten Pyridinbase gesichert. Es hat sich bewährt, die Hydrolyse mit 0,1 n Salzsäure bei  $120^\circ \text{C}$  (60 Minuten) im Bombenrohr durchzuführen. Die Lösung wurde nach der Hydrolyse neutralisiert, gefriergetrocknet, in wenig Wasser aufgenommen und entweder papierchromatographisch oder dünnschichtchromatographisch analysiert. Als Fließmittelsystem hatte sich besonders bewährt

n-Butanol / Äthanol / konz. Ammoniak / Wasser  
(110 : 10 : 20 : 10; V/V) (vgl. Papierchromatographie).

Durch Vergleich der  $R_F$ -Werte läßt sich eine gewisse Identifizierung erreichen. Zusätzlich wurden die den Vergleichssubstanzen entsprechenden UV-absorbierenden Flecken ausgeschnitten bzw. abgeschabt, mit Wasser eluiert und die UV-Spektren der so gewonnenen Substanzen geschrieben. Als Leerwerte dienten leere Papier- bzw. Adsorptionsmaterial-Areale, die in gleicher Weise behandelt wurden.

#### cb) Enzymatische Hydrolyse

Bei den labileren  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge, z.B. beim Thio- $\text{NADP}^+$  und Seleno- $\text{NADP}^+$  bewährte es sich, die eingebaute Pyridinbase enzymatisch durch die  $\text{NAD(P)}$ -Glycohydrolase abzuspalten (vgl. Abschnitt "Abbau von Thio- $\text{NAD(P)}^+$ ").

Der Reaktionsansatz wurde mit Hilfe von  $\text{HClO}_4$  enteiweißt, mit KOH neutralisiert, gefriergetrocknet, das substituierte Pyridinderivat mit Essigsäureäthylester extrahiert und anschließend durch Chromatographie identifiziert.

#### 10.) Synthese von $\text{NAD(P)}^+$ -Analogen in vivo

Man kennt heute eine große Zahl auch therapeutisch verwendeter Verbindungen, die in vitro enzymatisch zu  $\text{NAD(P)}^+$ -Analogen synthetisiert werden können. Ob sie aber in die Zellen eindringen und auch in vivo abnorm strukturierte Pyridinnucleotide bilden, ist bisher hauptsächlich vom 3-Acetylpyridin und 6-Aminonicotinamid untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der in vivo-Einbau von Thionicotinamid und Selenonicotinamid in  $\text{NAD(P)}^+$  geprüft.

##### a) Applikation:

###### aa) Thionicotinamid

250 mg wurden in 15 ml 1,2-Propylenglykol unter leichtem Erwärmen und unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde den Ratten per os durch eine Magensonde verabreicht und zwar meist 250 mg/kg Ratte.

###### ab) Selenonicotinamid

Selenonicotinamid wurde unter leichtem Erwärmen und unter Rühren teils in 1,2-Propylenglykol, teils in physiologischer NaCl-Lösung gelöst. Die Lösung wurde filtriert und der tatsächliche Gehalt spektrophotometrisch bestimmt.

Folgender Extinktionskoeffizient wurde für die Berechnung zugrunde gelegt:

$$\epsilon = 6,58 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol für Selenonicotinamid bei 327 nm. (vgl. S. 164)}$$

Die Lösung wurde den Ratten teils per os verabreicht (Propylenglykol), meist jedoch intraperitoneal appliziert (0.9 %ige NaCl), und zwar in Konzentrationen zwischen 1,6 mg/kg Ratte bis zu 100 mg/kg Ratte. In der pharmakologischen Schwellendosis und DL 50 bestehen sehr große Unterschiede, je nach Applikationsart (vgl. Einleitung).

#### b) Bestimmung der oxydierten Pyridinnucleotide (180-183)

##### ba) Bereitung der Organextrakte ( $\text{NAD(P)}^+$ und $\text{Thio-NAD(P)}^+$ )

Die Ratten werden durch Dekapitieren getötet, Leber und Gehirn so rasch wie möglich entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff geworfen. Lebern und Gehirne werden in gefrorenem Zustand bei  $+4^\circ\text{C}$  gewogen. Gehirngewicht ca. 1,5 g, von den Lebern wurden Stücke zu ca. 2 g abgenommen. Die Gehirne und Leberstücke wurden in einen vorgekühlten Porzellanmörser gegeben und unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Organpulver wurde mit Hilfe von gekühlten Porzellanlöffeln (Metallspatel vermeiden!) in große Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt, in denen sich eine berechnete Menge an eiskalter 6 %iger  $\text{HClO}_4$  befand. Das Gewichtsverhältnis von Organ zu  $\text{HClO}_4$  betrug bei Gehirn 1 : 3 und bei Leber 1 : 4. Mit Hilfe eines Magnetrührers oder eines Glasstabes wird das Organpulver mit der  $\text{HClO}_4$  kräftig durchmischt. Der Organbrei wird danach 45 Minuten lang bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig in Meßzylinder gegossen, das Volumen abgelesen und registriert, und pro ml werden 0,1 ml 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung

zur Stabilisierung beim Titieren pipettiert. In Bechergläsern wird anschließend am pH-Meter unter Eiskühlung und unter Rühren (Magnetrührer) mit 10 %iger KOH vorsichtig neutralisiert. Der Verbrauch an KOH wird aufgeschrieben. Das entstehende  $\text{KClO}_4$  läßt man ca. 15 Minuten absitzen (Eisbad). Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und möglichst sofort getestet.

bb) Test-Ansätze:

Es wurde meist in 2 cm-Küvetten gearbeitet.

Bestimmung von  $\text{NAD}^+$  und Thio- $\text{NAD}^+$  (NAD bei 340 nm, Thio-NAD bei 398 nm).

Gesamtvolumen: 5,21 ml, d = 2 cm, T = 25° C

4,0 ml Extrakt

1,0 ml Pyrophosphatpuffer, pH 8,8

0,1 ml Semicarbazid-Hydrochlorid, pH 7,4  
( $\hat{=}$  25 mg)

0,1 ml Äthanol

+0,01 ml Alkohol-Dehydrogenase (Pferdeleber)  
( $\hat{=}$  200  $\mu\text{g}$   $\hat{=}$  0,54 u)

Bestimmung von  $\text{NADP}^+$  und Thio- $\text{NADP}^+$

Gesamtvolumen: 5,2 ml, d = 2 cm, T = 25° C

4,0 ml Extrakt (siehe oben)

1,0 ml Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (0,05 M,  
pH 7,6)

0,1 ml  $\text{MgSO}_4$  (0,1 M)

0,1 ml Glucose-6-phosphat (16 mg/ml)  
( $\hat{=}$   $4,6 \cdot 10^{-2}$  m/l)

0,01 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Hefe)  
(50  $\mu\text{g}$   $\hat{=}$  7 u)

$\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  können auch in ein und derselben Testküvette nacheinander bestimmt werden. Dann wird in Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (0.05 M, pH 7.6) gearbeitet. Es wird dann alles zupipettiert, mit Ausnahme der Enzyme. Der Start erfolgt mit ADH. Nachdem keine Extinktionsänderung mehr eintritt, wird Glucose-6-phosphat-DH zugesetzt.

Es wird gegen Küvetten als Leerwert gemessen, die identisch mit den Meßküvetten sind, mit der Ausnahme, daß keine Enzyme zupipettiert werden. Ist nicht genügend Extrakt vorhanden, dann mißt man gegen Puffer.

#### c) Bestimmung der reduzierten Pyridinnucleotide(180, 183)

##### ca) Bereitung der Organextrakte

Ratten werden nach dem Dekapitieren Gehirne und Lebern entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff geworfen. Die tiefgefrorenen Organe werden gewogen und wie folgt bearbeitet:

Gehirn: 1,3 - 1,8 g Gehirn werden in einem vorgekühlten Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 9 ml 0.5 n KOH (0,33 mg Cystein/ml enthaltend) in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Da das Organhomogenat stark schäumt, wird es in 25ml-Erlenmeyerkolben überführt und absitzen gelassen. Anschließend wird in Bechergläser abpipettiert. Man erhält auf diesem Weg etwa 8 ml Gehirnsuspension.

Leber: 2,0 - 2,5 g Leber werden analog zu dem Gehirn aufgearbeitet. Man homogenisiert mit jeweils 10 ml 1 n KOH (0,34 mg Cystein/ml enthaltend). Beim Abpipettieren verbleiben etwa 9 ml Leberhomogenat.

Die Organhomogenate werden mit jeweils 2 ml Tris-Puffer (pH 7,4) versetzt und mit 1 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung auf pH 7,8 eingestellt.

Anschließend werden die Homogenate 15 Minuten in der Ultrazentrifuge (Spinco) bei 105.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird sofort zur Messung am Zeiss PMQ II verwendet. NADH und NADPH können nacheinander in derselben Küvette bestimmt werden. Zunächst wird NADH mit Hilfe der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt und nach Ablauf der Reaktion das NADPH. Vom Leberextrakt werden 2,7 ml zur Bestimmung eingesetzt (in 1 cm-Küvetten), vom Gehirnextrakt werden 5,45 ml eingesetzt (in 2 cm-Küvetten).

#### Meßansatz für Leberextrakt

NADH

|           |    |                                                       |
|-----------|----|-------------------------------------------------------|
| 2,7       | ml | Extrakt                                               |
| 0,03      | ml | gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung       |
| 0,2 - 0,6 | ml | Dihydroxyacetonphosphat-Lösung<br>( $\hat{=}$ 0,4 mg) |

---

|      |    |                                                                        |
|------|----|------------------------------------------------------------------------|
| 0,01 | ml | Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase<br>(100 $\mu\text{g}$ $\hat{=}$ 4 U) |
|------|----|------------------------------------------------------------------------|

NADPH:

Nachdem sämtliches NADH oxydiert ist, tritt keine Änderung der Extinktion mehr ein. Es werden nun in dieselbe Küvette zugegeben:

|      |    |                                                             |
|------|----|-------------------------------------------------------------|
| 0,02 | ml | $\alpha$ -Ketoglutar säure (1 M/l)                          |
| 0,01 | ml | Glutamat-Dehydrogenase<br>(200 $\mu\text{g}$ $\hat{=}$ 9 U) |

Meßansatz für Gehirnextrakte:

NADH:

5,4 ml Extrakt  
0,06 ml gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung  
0,6 ml Dihydroxyacetonphosphat-Lösung  
( 0,4 mg)  
0,01 ml Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase  
( $\hat{=}$  100  $\mu\text{g}$   $\hat{=}$  4 U)

NADPH:

Nach Ablauf der NADH-Oxydation werden nun in dieselbe  
Küvette zupipettiert:

0,02 ml  $\alpha$ -Ketoglutar säure (1 M/l)  
0,01 ml Glutamat-Dehydrogenase  
(200  $\mu\text{g}$   $\hat{=}$  9 U)

11. Citrat-Bestimmung

Männliche Wistarratten mit einem Gewicht von 100 - 200 g  
wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion mit  
0,9 %iger NaCl (Kontrolle) oder mit Selenonicotinamid de-  
kapitiert, Gehirn, Leber und Herz entnommen und sofort  
in flüssigem Stickstoff gefroren.

Die gefrorenen Organe wurden dann einzeln gewogen  
(Gehirn: 1,5 - 1,8 g / Leber: 1,1 - 1,8 g / Herz,  
jeweils 2 zusammen: 1 - 1,6 g) und in flüssigem Stick-  
stoff zermörsert. Das jeweilige Organpulver wird zusammen  
mit 6 %iger  $\text{KClO}_4$  (Gehirn 3-fach, Herz und Leber je  
4-fache Säuremenge) und 0,2 ml  $10^{-2}$  molarer Titriplex-  
Lösung (zur Stabilisierung gegen Metallionen) in einem  
großen Phywe-Plastikröhrchen mittels eines Turrax kurz  
homogenisiert und danach bei 11.000 U/min  $\hat{=}$  14.000 g  
20 Min. in der Phywe bei  $0^\circ\text{C}$  zentrifugiert.

Der Überstand wird nach Feststellung der genauen Menge am pH-Meter mit 10 %iger KOH auf einen pH-Wert von 7.6 - 7.7 eingestellt (unter Rühren und Eiskühlung). Das entstandene  $\text{KClO}_4$  setzt sich in einem Eisbad ab. Der klare Extrakt wird sofort zur Messung benutzt.

Meßansatz:

2,0 ml Extrakt (Hirn, Leber und Herz)  
 0,5 ml Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH = 7.6)  
 0,2 ml NADH-Lösung (25 mg NADH- $\text{Na}_2$ / 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest.  
 + 50 mg  $\text{NaHCO}_3$ )  
  
 + 0,04 ml LDH (Lactat-Dehydrogenase)  
 + 0,04 ml (Malat-Dehydrogenase)  
 + 0,02 ml Cl (Citrat-Lyase)

Die Messung erfolgte am Zeiss PMQ II mit Küvettenwechsel-automatik, bei 340 nm und 25° C Küvettenraumtemperatur.

12. Berechnung der Gewebekonzentrationen an  $\text{NAD(P)}^+$  etc.

Konzentration an  $\text{NAD(P)}^+$ , Citrat usw. in  $\mu\text{Mol/ml}$  Probelösung (g Gewebe).

$$\frac{\text{ml HClO}_4 + 0,8 \cdot \text{Gewebe (g)}}{\text{Überstand}} \times \frac{\text{Endmenge}}{\text{Gewebe in g}} \times \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot v \cdot \epsilon}$$

Endmenge: Überstand (abgemessen) + Lauge (ml) + Zusätze in ml ( $\text{Tris}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , EDTA usw.)

Es gilt:

$$\frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot v \cdot \epsilon} = \mu\text{Mol NADPH/ml Probelösung}$$

|                  |   |                                                                                                          |
|------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta E_{340}$ | = | Extinktionsdifferenz                                                                                     |
| V                | = | Testvolumen in ml                                                                                        |
| v                | = | Probenvolumen in ml                                                                                      |
| d                | = | Schichtdicke in cm                                                                                       |
| $\epsilon$       | = | spezifischer Extinktionskoeffizient (vgl. S. 127)<br>(6,22 cm <sup>2</sup> /μMol für NAD(P)H bei 340 nm) |

13. Test-Ansätze zur Enzymkinetik mit Dehydrogenasen

Testvolumen: 3 ml, Quarzküvette, 1 cm Schichtdicke,

Temperatur: 23 - 26<sup>0</sup> C.

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)

0,02 - 0,20 ml NADP<sup>+</sup>-Lösung  
(2,3 mg/ml NADP<sup>+</sup>, di-Natrium-Salz,  
Reinheitsgrad: 85 %  $\hat{=}$  2,63 · 10<sup>-3</sup> M/l  
+ 2,6 mg/ml Nicotinamid  $\hat{=}$  2,13 · 10<sup>-2</sup> M/l)

bzw.

0,02 - 0,20 ml Thio-NADP<sup>+</sup>-Lösung  
(2,3 mg/ml Thio-NADP<sup>+</sup>, di-Natrium-Salz,  
Reinheitsgrad: 85 %  $\hat{=}$  2,57 · 10<sup>-3</sup> M/l)

bzw.

0,02 - 0,20 ml Seleno-NADP<sup>+</sup>-Lösung  
(2,23 · 10<sup>-3</sup> M/l)

0,1 ml MgSO<sub>4</sub> (0,1 M/l)

0,1 ml Glucose-6-phosphat (15,6 mg/ml di-Na-  
trium-Salz, Reinheitsgrad: 77 %  $\hat{=}$   
4,61 · 10<sup>-2</sup> M/l)

- 0,1 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase  
 a) 5 mg/ml, spezifische Aktivität ca.  
 140 U/mg, Reinheitsgrad II,  
 Verdünnung 1 : 4.000 in eiskaltem  
 Wasser oder Tris-Puffer (0,2 M, pH 7.4)  
 b) 1 mg/ml, spezifische Aktivität 350 U/mg,  
 Reinheitsgrad I, Verdünnung 1 : 1.000  
 in eiskaltem Wasser oder Tris-Puffer
- ad 3,0 ml Tris-Puffer (0,2 M; pH 7.4)

Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42)

Coenzym-Lösungen wie beschrieben  
 (siehe Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)

- 0,1 ml  $\text{MgSO}_4$  (0,1 M/l)
- 0,1 ml DL-Isocitrat (24,0 mg/ml)  
 DL-Isocitrat, tri-Natrium-Salz,  
 Reinheitsgrad ca. 74 %  $\hat{=}$   $4,55 \cdot 10^{-2}$  M/l  
 L-Isocitrat)
- 0,2 ml Isocitrat-Dehydrogenase (10 mg/ml, spezifi-  
 sche Aktivität ca. 2 U/mg, Verdünnung in  
 Wasser/Glycerin (1 : 1; w/w).  
 Verdünnung 1 : 150 für die  $\text{NADP}^+$ -Probe  
 1 : 10 für die Thio- $\text{NADP}^+$ -Probe
- ad 3,0 ml Tris-Puffer (0,2 M; pH 7.4)

6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase (EC 1.1.144)

Coenzym-Lösungen wie beschrieben  
(siehe Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)

|     |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,1 | ml | MgSO <sub>4</sub> (0.1 M/l)                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 0,1 | ml | Gluconat-6-phosphat (20 mg/ml<br>Gluconat-6-phosphat, tri-Natrium-Salz,<br>Reinheitsgrad 71,5 % $\pm$ 5,18 $\cdot$ 10 <sup>-2</sup> M/l)                                                                                                                                                                                      |
| 0,1 | ml | 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase<br>(2 mg/ml, spezifische Aktivität<br>ca. 12 U/mg. Verdünnung in 2,8 M<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Lösung)<br>Verdünnung 1 : 130 für die NADP <sup>+</sup> -Probe<br>1 : 10 für die Thio-NADP <sup>+</sup> -<br>Probe<br>unverdünnt: Seleno-NADP <sup>+</sup> -Probe |

Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2)

|             |    |                                                                                                              |
|-------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,01 - 0,10 | ml | NADPH<br>(12 mg/ml NADPH, tetra-Natrium-Salz,<br>Reinheitsgrad 69 % $\pm$ 1,11 $\cdot$ 10 <sup>-2</sup> M/l) |
| bzw.        |    |                                                                                                              |
| 0,03 - 0,10 | ml | Thio-NADPH<br>(1,6 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> M/l)                                                             |
| bzw.        |    |                                                                                                              |
| 0,04 - 0,10 | ml | Seleno-NADPH (1,75 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> M/l)                                                             |
| 0,1         | ml | Rinderserum-Albumin (12 mg/ml<br>Phosphat-Puffer)                                                            |

|        |    |                                                                                                                                                                                                                |
|--------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,1    | ml | oxydiertes Glutathion (Reinheitsgrad 80 %, 60 mg/ml $\hat{=}$ $7,83 \cdot 10^{-2}$ M/l)                                                                                                                        |
| 0,1    | ml | Glutathion-Reduktase (1 mg/ml, ca. 90 U/mg, Verdünnung in 3,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung)<br>Verdünnung 1 : 600 für die NADPH-Probe<br>1 : 60 für die Thio-NADPH-Probe<br>rein: Seleno-NADPH-Probe |
| ad 3,0 | ml | Phosphat-Puffer (0,066 M; pH 7,4)                                                                                                                                                                              |

Leber-Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1)

|     |    |                                                                                        |
|-----|----|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 2,5 | ml | Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (0,05 M; pH 7,4)                                    |
| 0,1 | ml | Semicarbazid-Hydrochlorid (250 mg/ml; pH ca. 6,5)                                      |
| 0,1 | ml | Äthanol (96 %)                                                                         |
| 0,2 | ml | Coenzym-Lösung wie beschrieben (ca. $2,5 \cdot 10^{-3}$ M)                             |
| 0,1 | ml | Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase rein (10 mg/ml; spezifische Aktivität ca. 2,7 U/mg). |

14. Enzymatische Untersuchungen mit der alkalischen Phosphatase

Zur Bestimmung der Phosphatase wurde bei 25° C in Triäthanolamin-hydrochlorid-Puffer (0,05 M; pH 7,4; 0,001 M  $\text{MgSO}_4$ ; 0,0001 M  $\text{ZnSO}_4$ ) inkubiert.

In einem Ansatz mit 3,2 ml befanden sich zwischen 2,2 und  $34 \cdot 10^{-6}$  Mol an  $\text{NADP}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$ -Analogen (Thio- $\text{NADP}^+$ , Seleno- $\text{NADP}^+$ , 3-AcPyrADP<sup>+</sup>, 3-OHC-PyrADP<sup>+</sup>). Die Reaktion wurde mit  $4 \mu\text{g} \hat{=} 1,2$  U alkali-scher Phosphatase aus Kälberdarm gestartet.

Der aktuelle Gehalt der Inkubationsansätze an  $\text{NADP}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$ -Analogen wurde vor Zugabe der Phosphatase enzymatisch bestimmt. Erstmals wurden etwa 1 min nach Start der Reaktion und danach in Zeitabständen von meist 5 - 10 min Proben zu 0,2 ml entnommen und der zu diesem Zeitpunkt noch vorhandene Gehalt an Coenzym und Analogon in vorbereiteten Testansätzen bestimmt.

Die Konzentration an  $\text{NADP}^+$ , Thio- $\text{NADP}^+$ , Seleno- $\text{NADP}^+$  und 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> wurde mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ( $50 \mu\text{g} \hat{=} 7$  U pro Küvette) bestimmt. Ganz im Gegensatz zu den anderen Coenzym-Analogon, die sehr rasch reduziert werden, war die enzymatische Hydrierung des 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> unter diesen Bedingungen erst nach 120 min beendet. Die Testansätze wurden jedoch nach 60 min gemessen, da die Reaktion zu diesem Zeitpunkt schon zu mehr als 90 % abgelaufen war.

Der Gehalt an 3-AcPyrADP<sup>+</sup> wurde mit Hilfe der Isocitrat-Dehydrogenase ( $100 \mu\text{g} \hat{=} 0,2$  U pro Küvette) bestimmt. Die enzymatische Reaktion kommt hier erst nach 45 min vollständig zum Stillstand, der Testansatz wurde nach 30 min gemessen. Auch hier war zum Zeitpunkt der Messung die Reaktion zu mehr als 90 % abgelaufen.

Die Bildung von  $\text{NAD}^+$  bzw. von  $\text{NAD}^+$ -Analogon wurde fortlaufend spektrophotometrisch durch Registrierung der Zunahme der reduzierten Formen verfolgt. In einer

Küvette,  $d = 1$  cm, Temperatur =  $25^{\circ}$  C, befanden sich in 3,01 ml Triäthanolamin-hydrochlorid-Puffer (0,05 M; pH 7,4) 10 mg Semicarbazid-hydrochlorid,  $1,7 \cdot 10^{-3}$  Mol Äthanol, Alkohol-Dehydrogenase (Enzym aus Pferdeleber 200  $\mu$ g bzw. Enzym aus Hefe 280  $\mu$ g) und 0,2 ml Phosphatase-Inkubationsansatz. Zur Bestimmung von Thio-NAD<sup>+</sup>, 3-AcPyrAD<sup>+</sup> und 3-OHCPyrAD<sup>+</sup> wurde das Enzym aus Pferdeleber verwendet. Zur Bestimmung von eventuell gebildetem Seleno-NAD<sup>+</sup> wurde außerdem eine Küvette mit Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase angesetzt.

#### Messungen und Berechnungen

Die Absorptionsmessungen wurden entweder mit einem registrierenden Spektrophotometer Modell DK 2 A (Beckman) oder mit einem Zeiss-Spektrophotometer, Modell PMQ II durchgeführt.

Folgende Extinktionskoeffizienten wurden für die Berechnung zugrunde gelegt:

- $\epsilon = 6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  für NAD(P)H bei 340 nm (166, 184)
- $\epsilon = 9,00 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  für 3-AcPyrAD(P)H bei 365 nm (184, 185)
- $\epsilon = 9,30 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  für 3-OHCPyrAD(P)H bei 358 nm (184)
- $\epsilon = 11,7 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  für Thio-NAD(P)H bei 398 nm (166, 185)
- $\epsilon = 6,20 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  für Seleno-NAD(P)H bei 417 nm (59a)

## KAPITEL V

### Theoretische Überlegungen zur Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen (186, 187, 188)

#### Die Formulierung der Gleichung für die Initialgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion I. Ordnung

Nimmt man mit Michaelis und Menten an, daß der erste (189) Schritt einer enzymatisch katalysierten Reaktion die Bildung einer Verbindung zwischen Enzym und Substrat ist, so gilt:



Die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion wird sowohl durch das Verschwinden des Substrates als auch durch die Bildungsrate des Produktes angegeben.

Wird das Verhalten des Enzym-Substrat-Komplexes während der Umsetzung durch besondere Annahmen festgelegt, so kommt man zu einfachen Lösungen. Es werden 2 Möglichkeiten unterschieden:

a) Befindet sich die erste Teilreaktion der Umsetzung



im Gleichgewicht, so ist die Konzentration von  $(ES)_t$  in jedem Zeitpunkt festgelegt. Dies tritt ein, wenn  $k_1$  und  $k_{-1} \gg k_2$  sind und somit der Zerfall der Enzym-Substrat-Verbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion wird.

b) Da die besprochene Annahme nicht allgemein gültig sein kann, nehmen Briggs und Haldane eine stationäre Konzentration von  $ES_t$  (stationärer Zustand, steady state) an.

Kurz nach Beginn der Reaktion soll sich ein während des größten Teils der Reaktion gleichbleibender Spiegel an Enzym-Substrat-Verbindung gebildet haben, da Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit von ES gleich geworden sind. Solange dieses Fließgleichgewicht besteht, gilt:

$$\frac{d(ES)_t}{dt} \longrightarrow 0$$

Die unter diesen Voraussetzungen erhaltenen Gleichungen für den Ablauf einer enzymatisch katalysierten Reaktion gelten in keinem Fall für ihren allerersten Beginn und das Ende der Reaktion.

Da  $(E)_t$  nur in den seltensten Fällen meßbar ist, darf eine Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit diese Größe nicht enthalten. In geschlossenen Systemen gilt das Gesetz von der Konstanz der Stoffmengen. Es besagt, daß in jedem Augenblick einer Umsetzung die Summe aus der Konzentration des freien Enzyms  $(E)_t$  und des im Enzym-Substrat-Komplex gebundenen Enzyms  $(ES)_t$  gleich der Konzentration der gesamten im Versuch eingesetzten Enzymmenge  $(E)_0$  ist:

$$(E)_0 = (E)_t + (ES)_t$$

Die analoge Aussage gilt auch für das Substrat:

$$(S)_0 = (S)_t + (P)_t + (ES)_t$$

Michaelis und Menten behandelten die erste Möglichkeit für das Verhalten von ES. Zusätzlich dachten sie sich den Zerfall von ES als irreversibel:



Obwohl es sehr unwahrscheinlich ist, daß irgendeine Reaktion, die durch ein Enzym katalysiert wird, durch diese einfache Gleichung vollständig beschrieben werden kann, gibt es dennoch viele Situationen, in denen diese Formulierung zur Diskussion verschiedener Punkte ausreicht.

Wird die Initialgeschwindigkeit des Vorganges betrachtet

$$[(S)_t = (S)_o] \quad , \text{ so gilt:}$$

$$V_{OH} = \frac{K \cdot k_2 \cdot (E)_o (S)_o}{1 + K (S)_o}$$

In die von Michaelis und Menten erstmals abgeleitete Gleichung ging allerdings nicht die Bildungskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes ein, sondern dessen Zerfallskonstante ( $K_D$ )

$$K_D = \frac{1}{K} = \frac{(E)_t (S)_t}{(ES)_t}$$

$$V_{OH} = \frac{k_2 (E)_o (S)_o}{K_D + (S)_o}$$

$$V_{\max H} = k_2 (E)_o$$

$$V_{OH} = \frac{V_{\max H} (S)_o}{K_D + (S)_o} \quad \text{oder}$$

$$V_{OH} = \frac{V_{\max H} (S)_o}{K_m + (S)_o}$$

Die von Michaelis und Menten eingeführte Konstante ist nicht notwendigerweise identisch mit der Enzym-Substrat-Dissoziationskonstanten  $K_D$ .

Die Michaelis-Konstante  $K_m$  hängt von den relativen Größen (Geschwindigkeitskonstanten)  $k_1$ ,  $k_{-1}$  und  $k_2$  durch folgende Gleichung ab:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Wenn  $k_2$  vernachlässigbar klein ist, im Vergleich mit  $k_{-1}$  und sich  $K_m$  zu  $\frac{k_{-1}}{k_1}$  vereinfacht, dann ist  $K_m = K_D$ , der Enzym-Substrat-Dissoziationskonstanten. Nur  $K_D$  ( $K_S$ ) ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat, während  $K_m$  eine Konstante ist, die für eine bestimmte Reaktion definiert ist als die Substrat-Konzentration (Dimension: Mol/l) bei welcher die halbe maximale Geschwindigkeit  $\frac{V_{\max} H}{2}$  erreicht ist. Zur Bestimmung von  $K_m$  aus Anfangsgeschwindigkeiten empfiehlt es sich, die Substrat-Konzentration in dem Bereich von  $1/4 K_m$  bis zu  $10 K_m$  zu variieren.

Eine Vielzahl von reziproken Diagrammen wurde in Verbindung mit dieser Gleichung benutzt, um die Konstanten aus den Meßdaten der Anfangsgeschwindigkeiten zu bestimmen. Formt man obige Gleichung um, so kommt man zu:

$$\frac{1}{V_{OH}} = \frac{K_m}{V_{\max} H} \cdot \frac{1}{(S)_0} + \frac{1}{V_{\max} H}$$

In einem Diagramm, in welchem  $\frac{1}{V_{OH}}$  gegen  $\frac{1}{(S)_0}$  aufgetragen ist, schneidet die Gerade die y-Achse bei  $1/V_{\max}$  (d. h.  $\frac{1}{V_{OH}} = \frac{1}{V_{\max} H}$  wenn  $(S) \rightarrow \infty$  und  $\frac{1}{(S)} \rightarrow 0$  geht) und die x-Achse bei  $-\frac{1}{K_D}$

(d. h.  $1/V_{OH} = 0$ , dann gilt  $-\frac{1}{K_m} = \frac{1}{(S)_0}$  ).

Diese Form der Darstellung und Auswertung wird für gewöhnlich mit den Namen von Lineweaver und Burk verknüpft. (190)

Andere gebräuchliche reziproke Diagramme wurden von (191-193) Eadie (1942) und Hofstee (1952) vorgeschlagen. Durch Umformen der obigen Gleichung kommt man zu

$$V_{OH} = V_{max} H - \frac{V_{OH}}{(S)_0} \cdot K_m$$

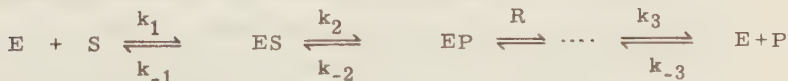
und eine Gerade mit  $V_{OH}$  als Ordinate und  $\frac{V_{OH}}{(S)_0}$  als Abszisse besitzt die Neigung  $-K_m$ , der Ordinatenabschnitt den Wert  $V_{max}$  und der Abszissenabschnitt den Wert  $V/K_m$ .

Eine andere Umformung der Ausgangsgleichung ergibt:

$$\frac{(S)_0}{V_{OH}} = \frac{(S)_0}{V_{max} H} + \frac{K_m}{V_{max} H}$$

Trägt man  $\frac{(S)_0}{V_{OH}}$  auf der Ordinate gegen  $(S)_0$  auf der Abszisse auf, so hat  $V_{OH}$  die Neigung der Geraden den Wert  $1/V_{max}$ , der Ordinatenabschnitt den Wert  $\frac{K_m}{V_{max} H}$  und der Abszissenabschnitt den Wert  $-K_m$ .

Es ist sehr wahrscheinlich, daß selbst während einer einfachen enzymatisch katalysierten Einsubstratreaktion verschiedene zusätzliche Zwischenprodukte existieren, wenn auch von zu vernachlässigender Konzentration. Es ist z.B. auch sehr wahrscheinlich, daß ein Enzym-Produkt-Komplex entsteht:



Der Vorgang kann durch eine Geschwindigkeitskonstante beherrscht werden, wenn diese wesentlich kleiner als alle anderen ist.

Bei vielen Enzymreaktionen sind mehrere Substrate beteiligt und durch eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen können verschiedene Schritte bestimmend für die Umsatzgeschwindigkeit werden. Auf diese Weise kann eine Anzahl von Enzym-Zwischenprodukten demonstriert werden.

Viele Dehydrogenasen zeigen ein Verhalten gemäß der Michaelis-Menten-Kinetik über einen weiten Konzentrationsbereich des Substrats, d.h. sie geben lineare Lineweaver und Burk-Diagramme im Hinblick auf jedes Substrat bei konstant gehaltenen Konzentrationen des anderen. Wenn nur ein weiteres Substrat außer dem Coenzym benötigt wird, können die kinetischen Daten nach Dalziel durch folgende Gleichung beschrieben werden: (194)

$$\frac{(E)_0}{V_0} = \emptyset_0 + \frac{\emptyset_1}{S_1} + \frac{\emptyset_2}{S_2} + \frac{\emptyset_1 \cdot 2}{S_1 S_2}$$

worin  $(E)_0$  die Konzentration der gesamten, im Versuch eingesetzten Enzymmenge ist (im einfachsten Fall als mg Protein).

Die 4 Koeffizienten sind einfachere Funktionen der Reaktionskonstanten als die Michaelis-Konstanten und können graphisch aus Neigung und Achsenabschnitten sekundärer Diagramme bestimmt werden, die auf primären Lineweaver-Burk-Diagrammen beruhen.

Mit Hilfe dieser kinetischen Konstanten kann bei einer enzymatisch katalysierten Zweisubstratreaktion ein bestimmter Reaktionstyp ermittelt werden (vgl. Dalziel 1957 und Apps, 1968). (194, 14)

Kinetik der Zwei-Substrat-Reaktion (188, 194-196)

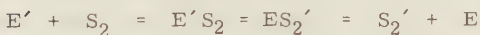
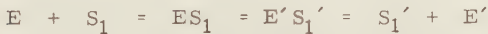
Die enzymatisch katalysierten Reaktionen, bei welchen zwei Substrate gleichzeitig umgesetzt werden, sind weit verbreitet. Auch hier entstehen Enzym-Substrat-Komplexe. Unter der Annahme, daß ein Enzym mit einem aktiven Zentrum pro Molekül vorliegt oder mit verschiedenen identischen und unabhängigen aktiven Zentren, kann man zwei Mechanismen unterscheiden:

Bildung binärer Komplexe (Enzym und ein Substrat, "double displacement", "ping-pong").

Bildung ternärer Komplexe (Enzym und zwei Substrate, "single displacement").

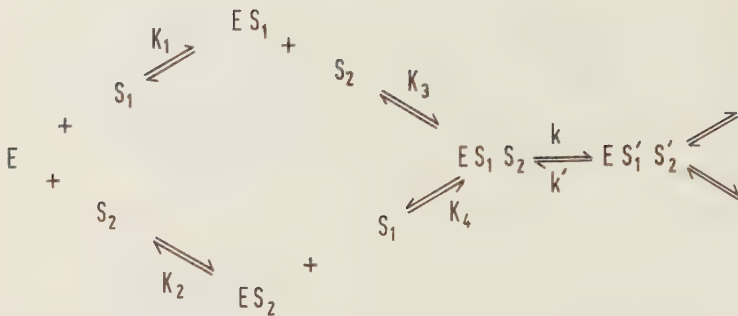
Die Substrate addieren sich entweder wahllos an das Enzym (random order) oder in festgelegter Reihenfolge (compulsory order).

Bei dem Reaktionstyp der unter Bildung binärer Komplexe abläuft, wird ein Zwischenprodukt gebildet durch die Reaktion von einem Substrat mit dem Enzym, ohne daß es zur Addition des zweiten Substrates kommt, und es wird eine zweite stabile Enzym-species  $E'$  gebildet:



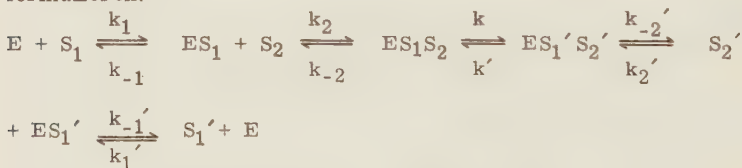
Für diesen Mechanismus wird das letzte Glied in der obigen Gleichung  $\emptyset_{12} = 0$

Die allgemeinste Formulierung des Reaktionstyps, für den die Bildung ternärer Komplexe postuliert wird, wurde erstmals von Haldane für eine Zweisubstrat-Reaktion vorgeschlagen:



Bei diesem "random order"-Mechanismus können nicht von vornherein lineare Lineweaver-Burk-Diagramme erwartet werden.

Der "compulsory order"-Mechanismus läßt sich wie folgt formulieren:



Es hat den Anschein, daß dieser Mechanismus mit  $S_1$  = Coenzym für verschiedene Dehydrogenase-Reaktionen gilt, wie z.B. für die Leber-Alkohol-Dehydrogenase oder Malat-Dehydrogenase,

### 3-Substrat-Reaktionen (195, 196)

Bei den NADP-abhängigen decarboxylierenden Enzymen Isocitrat-Dehydrogenase, 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase und dem malic enzyme sind zusätzlich zum Coenzym zwei Substrate bei der Reaktion in einer Richtung beteiligt:



Von Dalziel wurden in jüngster Zeit auch für diese 3-Substrat-Reaktionen Gleichungen aufgestellt, die, wieder auf Lineweaver-Burk-Diagrammen basierend, eine theoretische Behandlung dieser Rückreaktionen erlauben. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur die Hirnreaktionen bei diesen Enzymen untersucht.

#### Untersuchung des Hemmtyps (187)

Auf folgende Hemmungstypen, die hier nur kurz gekennzeichnet werden, wurde besonders geachtet:

- a) die kompetitive Hemmung: Der Inhibitor reagiert reversibel mit einer Bindungsstelle des Enzyms und verhindert dadurch die Bildung jener Komponente der Enzym-Reaktion, die unter normalen Umständen einen Komplex an dieser Bindungsstelle bildet. Auf diese Weise kann ein Inhibitor kompetitiv sein in Bezug auf das Substrat, auf das Coenzym oder auf den Aktivator. Diesen Hemmungstyp kann man bei Reaktionen erwarten, die durch Dehydrogenasen katalysiert werden, wenn NAD(P)<sup>†</sup>-Analoge eingesetzt werden, die infolge ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem natürlichen Coenzym, dessen Reaktionsort besetzen können.
- b) die nichtkompetitive Hemmung: Der Inhibitor reagiert mit einer Stelle, die nicht mit dem aktiven Zentrum identisch ist, so daß die Bindung des Substrates mit der Substrat-Bindungsstelle unbeeinflusst ist, aber der Zerfall des Enzym-Substratkomplexes beeinträchtigt ist.

In diesem Fall hängt der Grad der Hemmung nicht von  $K_s$  ab, sondern ausschließlich von  $(I)$  und  $K_i$ , der Inhibitor-Dissoziations-Konstanten.

Manche Hemmungen sind teilweise kompetitiv oder von einem gemischten Typ. Besonders sollte jedoch eine nichtkompetitive Hemmung sorgfältig überprüft werden. Es ist ersichtlich, daß reine nichtkompetitive Hemmungen ziemlich ungewöhnlich sind, da es unwahrscheinlich ist, daß ein Inhibitor sich an das Apoenzym binden kann in einem Gebiet, das dicht genug beim aktiven Zentrum des Substrates liegt, um den Zerfall des ES-Komplexes zu verhindern, ohne gleichzeitig die Bindung des Substrates in einem gewissen Ausmaß zu beeinflussen und ohne daß auf diese Weise eine kompetitive Komponente in die Hemmung einfließt.

- c) unkompetitive Hemmung: Dieser Typ der Hemmung ist eine spezielle Form der gemischten Hemmung. Der Inhibitor vergrößert die Affinität des Enzyms zum Substrat. Wenn der Zerfall des Substrat-Komplexes unbeeinflußt oder gar beschleunigt ist, so resultiert eine Aktivierung. Wenn jedoch der EIS-Komplex nicht in Produkte zerfällt, dann führt die vermehrte Bindung des Substrates zu einer Hemmung. Trägt man  $1/v$  gegen  $1/(S)$  oder  $1/v$  gegen  $(I)$  auf, so erhält man parallele Linien. Beispiele für die unkompetitive Hemmung sind selten. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß dieser Mechanismus angenommen werden muß bei Komplexen, die zwischen einer Vielzahl von Inhibitoren und dem E-DPN-Komplex verschiedener Dehydrogenasen gebildet werden.

Die Bestimmung des Hemmungstyps und der Hemmungskonstanten erfolgte nach folgenden Methoden:

# Methoden der grafischen Analyse

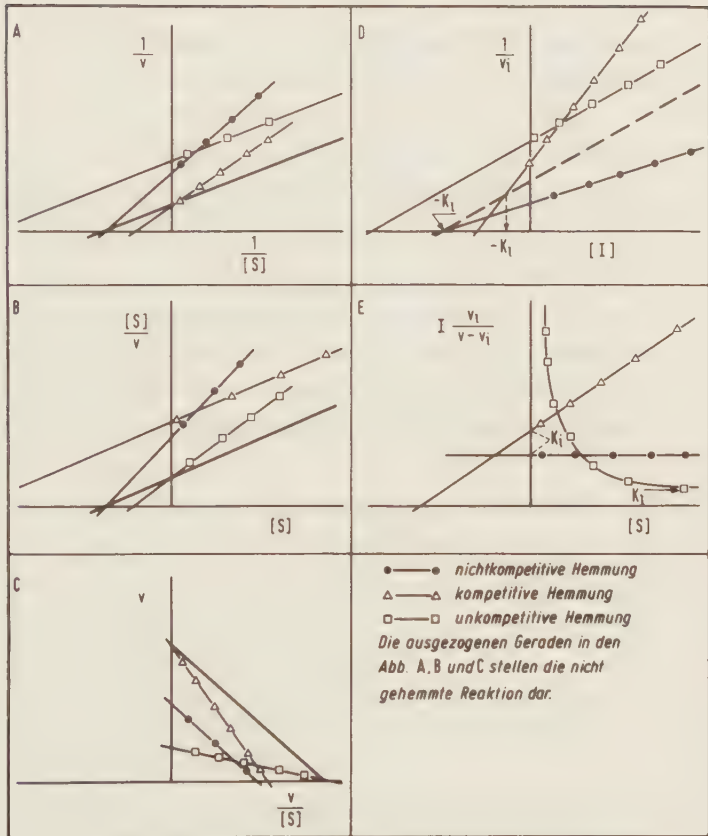


Abb. 30

- A) Diagramm  $1/v$  gegen  $1/(S)$   
nach Lineweaver und Burk (1934) (190)
- B) Diagramm  $\frac{(S)}{v}$  gegen  $(S)$  bzw.  $\frac{(S)}{v_i}$  gegen  $(S)$   
ebenfalls von Lineweaver und Burk vorgeschlagen.
- C) Diagramm  $v$  gegen  $\frac{v}{(S)}$  bzw.  $v_i$  gegen  $\frac{v_i}{(S)}$   
Diese Methode wurde erstmals von Augustinsson (1948) benutzt (197) und von Hofstee (1956) (192, 193) weiter ausgearbeitet.
- D) Diagramm  $\frac{1}{v}$  gegen  $(I)$   
eine der gebräuchlichsten Methoden, die besonders von Dixon (1953) entwickelt wurde (198, 199).
- E) Das Diagramm  $(I) \frac{v_i}{v - v_i}$  gegen  $(S)$   
Diese Methode wurde von Hunter und Downs (1945) eingeführt (200).

## Kapitel VI

### Präparative Vorschriften

#### Allgemeines

Die angegebenen Ausbeuten entsprechen den Durchschnittswerten, wie sie sich aus mehreren Ansätzen ergaben.

Es werden typische Reaktionsansätze angegeben.

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Lindström-Block bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die Spektren im sichtbaren und UV-Bereich wurden mit einem selbstregistrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman, Modell DK 2 A in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm aufgenommen. Als Lösungsmittel diente in den meisten Fällen dest. Wasser bzw. Puffer, gelegentlich Methanol.

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Infrarotspektrophotometer Modell 237 bzw. 621 aufgenommen. Die Substanzen (1 mg) lagen als KBr-Preßlinge vor.

Das Massenspektrum wurde mit einem Gerät der Firma Varian, Modell CH 4 erhalten.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian-Gerät, Modell A-60 aufgenommen.

Die Elementaranalysen - mit Ausnahme der selenhaltigen Substanzen - wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium Dr. Franz Pascher, 53 Bonn, Buschstr. 54, ausgeführt.

Die Selen-Verbindungen wurden der Physikalisch-chemischen Abteilung der Schering AG, Berlin, analysiert.

Tabelle 15

Verwendete Lösungsmittelsysteme für die synthetisierten Pyridin-Derivate

|                                                | Bezeichnung                     | System                                                     | Zusammensetzung (v/v)         | Laufzeit                                 |
|------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|
| S-Oxyde<br>N <sup>1</sup> -Methyl-<br>derivate | FM 1                            | Benzol/Aceton/Äthanol <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub> (25 %) | 40 : 40 : 10 : 5              | ca. 1 h für 16 cm                        |
|                                                | FM 2                            | Methyläthylketon/Methanol <sup>+</sup>                     | 90 : 15                       | ca. 1 h für 16 cm                        |
|                                                | FM 3                            | n-Butanol/Äthanol/NH <sub>3</sub> (25 %)/Wasser            | 110 : 10 : 20 : 10            | ca. 4 1/2 h für 16,5 cm                  |
|                                                | FM 4                            | Toluol/Methanol                                            | 80 : 20                       | ca. 1 h für 16 cm                        |
|                                                | FM 5                            | n-Butanol/Eisessig/Wasser                                  | 70 : 5 : 33                   |                                          |
|                                                | FM 6                            | n-Butanol/Eisessig/Wasser                                  | 100 : 22 : 50                 | ca. 3 h für 10 cm                        |
|                                                | FM 7                            | n-Butanol/Methanol/Eisessig/Wasser                         | 90 : 35 : 15 : 60             | ca. 2 h für 10 cm                        |
| Urinmetaboliten                                | FM 8                            | n-Butanol gesättigt mit 3 %igem Ammoniak                   |                               | für Papierchromatographie und Cellulose- |
|                                                | FM 9                            | sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser                           | 75 : 15 : 10                  | phie und Cellulose-                      |
|                                                | FM 10<br>(entspricht etwa FM 6) | n-Butanol/Eisessig/Wasser                                  | 40 : 10 : 20<br>100 : 25 : 50 | Dünnschicht-Platten                      |

<sup>+</sup> oder beliebiger anderer Alkohol

z.B. Methanol, Äthanol, n-Propanol

1.) Darstellung von 6-Amino-3-cyanopyridin

a) aus 2-Amino-5-nitropyridin durch Abwandlung einer Vorschrift von C. R  th und G. Prange (1928) (129)

---

aa) 2, 5-Diamino-pyridin

In 3 Gewichtsteile Eisenpulver, die in einer Porzellanschale mit Wasser zu einem dicken Brei angerührt werden, wird auf dem Wasserbade nach Zusatz von etwas Eisessig allmählich 1 Teil 2-Amino-5-nitropyridin unter stetigem Rühren eingetragen. Hierbei tritt sehr bald starke Gasentwicklung und Selbsterwärmung ein. Von Zeit zu Zeit muß das verdunstete Wasser unter Zusatz von etwas Eisessig ersetzt werden. Nach Beendigung der Hauptreaktion wird noch etwa eine Stunde unter Rühren auf dem Wasserbade erwärmt und sodann das dickflüssige Reaktionsgemisch durch Zugabe von calc. Soda alkalisch gemacht und entwässert. Das gut getrocknete Gemisch wird dann fein gepulvert und daraus unmittelbar im Wasserstrahlvakuum die Base sublimiert. Man erhält nahezu farblose (ganz schwach rötliche) Nadeln vom Schmelzpunkt 108 - 110<sup>o</sup> C. Die Base ist sehr leicht zersetzlich, selbst in der zugeschmolzenen Glasampulle bei -10<sup>o</sup> C.

|                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Eingesetzt wurden insgesamt | 30,0 g 2-Amino-5-nitropyridin    |
| Ausbeute                    | 4,5 g $\hat{=}$ 19 % der Theorie |

|                           |         |        |         |
|---------------------------|---------|--------|---------|
| $C_5H_7N_3$ (MG: 109,132) | C       | H      | N       |
| Ber. :                    | 55,03 % | 6,47 % | 38,51 % |
| Gef. :                    | 56,00 % | 6,80 % | 37,79 % |

| UV : <u>in CH<sub>3</sub>OH</u> |            | <u>in CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O + 0,1 n HCl</u> |            |
|---------------------------------|------------|-------------------------------------------------------|------------|
| $\lambda$                       | $\epsilon$ | $\lambda$                                             | $\epsilon$ |
| 205                             | 7.370 EA   | 205                                                   | 6.320 EA   |
| 245                             | 12.000     | 234                                                   | 11.300     |
| 328                             | 3.220      | (252)                                                 | 4.020)     |
|                                 |            | 312                                                   | 4.300      |
|                                 |            | (354)                                                 | 1.320)     |

EA = Endabsorption

# IR

|                           |                              |
|---------------------------|------------------------------|
| 3370 cm <sup>-1</sup> (s) | N-H-Valenzschwingungen       |
| 3295 cm <sup>-1</sup> (m) | primäres Amin                |
| 1630 cm <sup>-1</sup> (s) |                              |
| 1610 cm <sup>-1</sup>     | N-H-Deformationsschwingungen |
| 1570 cm <sup>-1</sup> (m) |                              |

UV, IR: Zur Konstitution kein Widerspruch

## ab) 6-Amino-3-cyanopyridin aus 2,5-Diamino-pyridin

Zur Überführung in das Hydrochlorid werden 550 mg 2,5-Di-aminopyridin in Äther gelöst. Man engt die Lösung auf ca. 20 ml ein und versetzt mit dem gleichen Volumen äther. Salzsäure (abs. Äther bei O<sup>0</sup> mit Chlorwasserstoff gesättigt). Das ausgefallene Hydrochlorid wird abzentrifugiert und zweimal mit Äther gewaschen.

Das Hydrochlorid wird in 20 ml 5 n HCl gelöst und bei 0 - 5° C langsam mit der Lösung von 400 mg  $\text{NaNO}_2$  in 20 ml Wasser versetzt. Nach frühestens 10 Min., unmittelbar vor Durchführung der Sandmeyer-Reaktion, wird die Lösung durch Zusatz von  $\text{KHCO}_3$  (ca. 13,5 g) auf pH 6 gebracht, außerdem gibt man einige ml Eiswasser hinzu.

Herstellung der K  $[\text{Cu}(\text{CN})_2]$  -Lösung: Zu der Lösung von 50 Teilen  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  in 200 Teilen Wasser gibt man unter ständigem Erhitzen auf dem Wasserbad die Lösung von 55 Teilen KCN in 100 Teilen Wasser und filtriert nach dem Abkühlen.

Die Sandmeyer-Reaktion wird im 1.000 ml-3-Halsrundkolben und mechanischer Rührvorrichtung (Magnetrührer) durchgeführt. Die gekühlte, neutralisierte Diazonium-Salz-Lösung befindet sich in einem Tropftrichter. Der ausgezogene Auslauf des Tropftrichters mündet unter der Oberfläche der vorgelegten K  $[\text{Cu}(\text{CN})_2]$  -Lösung.

Der mit Eiswasser gekühlte Reaktionskolben wird mit 30 ml K  $[\text{Cu}(\text{CN})_2]$  -Lösung und 200 ml Äther beschickt. Unter kräftigem Rühren läßt man innerhalb von 10 Min. die Diazonium-Verbindung eintropfen, rührt 1 h nach und läßt einige Stunden bei Raumtemperatur stehen, dann wird die Ätherphase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 100 ml Tetrahydrofuran/Äther (1 : 1) nachextrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleiben als Rückstand 300 mg (bis zu 50 % der Theorie).  
Schmelzp.: 161° C

b) Darstellung von 6-Amino-3-cyanopyridin aus 2-Amino-  
5-brompyridin

---

eingesetzte Mengen:

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| 10,0 g ( $\hat{=}$ 0,0578 Mole) | 2-Amino-5-brompyridin |
| 5,710 g ( $\hat{=}$ 0,06 Mole)  | Cu(I)CN               |
| in 12,0 ml                      | N.N-Dimethylformamid  |

2-Amino-5-brompyridin und Cu(I)CN werden in einen 100 ml Rundkolben eingewogen. Danach wird das gereinigte N.N-Dimethylformamid (vgl. Reinigungsmethode im Organikum S. 623) hinzupipettiert. Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren (Magnetrührer) 4 h am Rückfluß gehalten (Paraffinbad). Der Kühler trägt ein Trockenrohr, das mit KOH gefüllt ist.

Nach der 4-stündigen Kochzeit wird der Kühler entfernt und das Dimethylformamid über eine kurze Brücke im Wasserstrahlvakuum ganz vorsichtig abgezogen. Das Vakuum wird langsam gesteigert, denn starkes Brodeln und Schäumen muß vermieden werden. Dauer des Abziehens ca. 45 Min.. Man läßt noch ca. 1 Stunde unter vollem Wasserstrahlvakuum stehen (Badtemperatur + 172° C), um das Lösungsmittel möglichst vollständig aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Danach läßt man abkühlen.

Der erstarrte, dunkelbraune Reaktionskuchen läßt sich leicht zerstoßen und die Stücke aus dem Kolben entfernen. Der Kupferkomplex des 6-Amino-3-cyanopyridins wird in 5 g-Portionen geteilt. Die einzelnen Portionen werden im Porzellanmörser fein zerrieben und in je einen 100 ml Schliff-Erlenmeyer überführt, um darin das 6-Amino-3-cyanopyridin zu sublimieren.

6-Amino-3-cyanopyridin wird im vollen Wasserstrahlvakuum vorsichtig mit kleiner offener Flamme sublimiert. Es empfiehlt sich, vorsichtig zu erhitzen, damit die Schmelze nicht spritzt und das Sublimat nicht wieder schmilzt. Das Sublimationsgut schlägt sich schon 2 - 3 cm über dem Gefäßboden nieder.

Dauer - ca. 30 - 45 Minuten

Als Sublimationsapparatur hat sich ein 100 ml Schliff-Erlenmeyer, verbunden mit einem geraden Zwischenstück mit 2 NS 29 Schliffen am geeignetsten erwiesen. Die Ausbeuten im Erlenmeyerkolben sind denen im Rundkolben überlegen.

Ausbeute: 56 - 62 % der Theorie.

Das Rohprodukt wurde aus Äthanol mit Aktivkohle umkristallisiert.

Schmelzp.:  $164^{\circ}\text{C}$  (Literatur: Schmelzp.  $164^{\circ}\text{C}$ )

|                                                |         |        |         |
|------------------------------------------------|---------|--------|---------|
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$ (MG: 119,127) | C       | H      | N       |
| Ber. :                                         | 60,51 % | 4,23 % | 35,28 % |
| Gef. :                                         | 60,74 % | 4,2 %  | 35,35 % |

| UV: in Wasser |            | 0,1 n HCl/Wasser |            |
|---------------|------------|------------------|------------|
| $\lambda$     | $\epsilon$ | $\lambda$        | $\epsilon$ |
| 263           | 21,46      | 303              | 5,27       |
|               |            | 255              | 18,72      |

IR:  $2214\text{ cm}^{-1}$  (s)  $-\text{C}\equiv\text{N}$  - Valenzschwingung

## 2.) Darstellung von 6-Amino-thionicotinamid

a) nach der Methode von Karrer und Schukri (1945) (41)

### eingesetzte Mengen:

5,8 g 6-Amino-3-cyanopyridin

20 ml Äthanol

110 ml Äthanol gesättigt mit  $\text{NH}_3$ -Gas

110 ml abs. Äthanol werden unter Eiskühlung mit trockenem Ammoniak-Gas (durch Trockenturm, mit KOH Plätzchen) gesättigt.

5,8 g 6-Amino-3-cyanopyridin werden in 20 ml Äthanol aufgeschlämmt und 110 ml alkoholisches Ammoniak zugesetzt, worauf sich die Kristalle lösen. Hierauf sättigt man die Lösung unter Eiskühlung mit trockenem  $\text{H}_2\text{S}$  (durch  $\text{CaCl}_2$ -Turm geleitet) und läßt sie 2 - 3 Tage verschlossen bei Zimmertemperatur stehen. Danach wird die gesamte Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt; es wird noch 2 - 3mal je ca. 20 ml Äthanol hinzugegeben und erneut zur Trockne eingeeengt.

Das Rohprodukt, welches sehr unangenehm riecht, wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 371 g  $\hat{=}$  49 % der Theorie

b) nach der Methode von Fairfull, Lowe und Peak (1952) (128)

### eingesetzte Mengen:

1,5 g 6-Amino-3-cyanopyridin

ca. 50 ml Pyridin abs.

2,1 ml Triäthylamin (spez. Gewicht =  $0,72 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$  )

MG: 101,19 ( $\hat{=}$  1,51 g)

Das Nitril wurde in Pyridin gelöst (2-Halskolben) und Triäthylamin im Verhältnis Mol : Mol zugegeben.

Trockener Schwefelwasserstoff (durch  $\text{CaCl}_2$ -Turm geleitet) wird in stetigem Strom etwa 1 1/2 - 2 Stunden durch die Lösung geleitet (unter Eiskühlung). Man läßt die Lösung 2 - 3 Tage verschlossen bei Zimmertemperatur stehen.

Danach wird die Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt; es werden noch mehrmals kleine Mengen Methanol (jeweils ca. 20 ml) zugegeben und ebenfalls zur Trockne eingengt.

Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert.

Schmelzp.: 173 - 174° C

Ausbeute: 1,5 g  $\hat{=}$  77,5 % der Theorie

| $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$ (MG: 153, 21) | C       | H      | N       | S       |
|--------------------------------------------------------|---------|--------|---------|---------|
| Ber. :                                                 | 47,04 % | 4,61 % | 27,43 % | 20,93 % |
| Gef. :                                                 | 47,00 % | 4,50 % | 27,40 % | 21,10 % |

| UV: in Wasser |            | Wasser/0,1 n HCl |            | Wasser/0,1 n NaOH |            |
|---------------|------------|------------------|------------|-------------------|------------|
| $\lambda$     | $\epsilon$ | $\lambda$        | $\epsilon$ | $\lambda$         | $\epsilon$ |
| 315,5         | 15,36      | 302,5            | 13,80      | 312               | 12,68      |
|               |            | 271              | 13,52      |                   |            |

IR: Das Infrarotspektrum des 6-Amino-thionicotinamids hat sehr große Ähnlichkeit mit demjenigen des 6-Amino-nicotinamids. Die Absorptionsbanden des Carbonsäurethioamids sind etwas nach kleineren Wellenzahlen (größeren Wellenlängen) verschoben. Lediglich im Bereich zwischen  $750\text{ cm}^{-1}$  -  $900\text{ cm}^{-1}$  sind deutliche Unterschiede zu sehen.

IR : 6-Amino-thionicotinamid  
892  $\text{cm}^{-1}$  (s), 850  $\text{cm}^{-1}$  (m), 827  $\text{cm}^{-1}$  (s)

IR : 6-Amino-nicotinamid  
864  $\text{cm}^{-1}$  (w), 845  $\text{cm}^{-1}$  (m), 810  $\text{cm}^{-1}$  (w, breit)

3.) Versuch der Darstellung von 6-Amino-thionicotinamid  
durch direkte Schwefelung von 6-Amino-nicotinamid mit  
Phosphorpentasulfid

---

a) Umsetzung in wasserfreiem Pyridin

eingesetzte Mengen:

1 g 6-Amino-nicotinamid (6-AN)  
700 mg bis 2 g  $\text{P}_4\text{S}_{10}$   
7,0 ml Pyridin, getrocknet  
1 h bis 4 1/2 Stunden am Rückfluß gekocht.

Zu einer Lösung von 6-AN (1 g) in getrocknetem Pyridin (7 ml) wurde Phosphorpentasulfid unter Rühren zugegeben, und das Gemisch wurde 1 h bis 4 1/2 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Pyridin-Lösung von dem festen Rückstand dekantiert, auf 1/3 ihres ursprünglichen Volumens eingeengt und unter Rühren in 100 ml Äthanol gegossen. Es fiel wenig Schwefel aus, der abfiltriert wurde. Das gelb gefärbte Filtrat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Es blieb ein orange-gefärbter klebriger Rückstand, der sich nicht in  $\text{CS}_2$  löste.

Dieser viskose Rückstand wurde nach Zusatz von n-Hexan fest. Das so erhaltene feste Produkt wurde in Äthanol gelöst, die Lösung filtriert und am Rotationsverdampfer so weit eingeengt, bis ein amorphes Produkt auszufallen begann.

Schmelzpunkt:  $150 - 157^{\circ} \text{C}$  (ohne Zersetzung)

Nach Umkristallisation aus Äthanol betrug der Schmelzpunkt  $156 - 158^{\circ} \text{C}$ .

Diese Substanz wurde nun der DC unterworfen auf Kieselgel HF<sub>254</sub>, 0,5 mm dick.

Fließmittelsystem: FM 3

Als Vergleichssubstanzen liefen mit: 6-AN, 6-Amino-3-cyanopyridin und 6-Amino-thionicotinamid.

Die Flecken wurden abgekratzt, mit Aceton eluiert und das Eluat zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in dest. Wasser aufgenommen und die UV-Spektren geschrieben. Dabei zeigte es sich, daß das hier gewonnene gelbe Produkt mit dem Schmelzpunkt  $156 - 158^{\circ} \text{C}$  ein UV-Spektrum zeigt, das mit 6-Amino-3-cyanopyridin identisch ist. Dafür spricht auch der Schmelzpunkt, der für ein etwas verunreinigtes Produkt ungefähr bei  $160^{\circ} \text{C}$  liegt. Es ist also keine Schwefelung des 6-AN eingetreten, sondern unter Wasserabspaltung ist das Nitril entstanden.

#### b) durch Zusammenschmelzen im Porzellanmörser

##### eingesetzte Mengen:

1 g 6-Amino-nicotinamid (6-AN)

2 g  $\text{P}_{4}\text{S}_{10}$

6-AN (1 g) wurde in einem Porzellanmörser auf  $70^{\circ} \text{C}$  erwärmt (Heizplatte auf Stellung 6 bei 250 W). Danach wurde das  $\text{P}_{2}\text{S}_{5}$  zugegeben und unter kräftigem Druck wurden die beiden Substanzen mit dem Pistill verrieben (95 Minuten bei  $70 - 110^{\circ}$ ). Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit insgesamt 500 ml Methanol extrahiert.

Die gelb-gefärbte Lösung wurde abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis auf ca. 20 ml eingeeengt und in ein Zentrifugenglas dekantiert. Es wurde etwa das gleiche Volumen an Diäthyläther dazugegeben. Es fiel ein weißlicher Niederschlag aus, der in der Tischzentrifuge abzentrifugiert wurde. Der gelb-gefärbte Überstand wurde in eine Kristallisierschale gegossen und zur Trockne eingeeengt. Es blieb ein gelber Sirup zurück, der sich gut in Methanol löste. Es gelang jedoch nicht, mit n-Heptan oder Diäthyläther ein kristallines Produkt zu fällen. Im Sirup bildeten sich beim Stehenlassen Kristallkeime. Es wurde ein UV-Spektrum geschrieben. Dieses zeigte Übereinstimmung mit demjenigen von auf anderem Wege synthetisierten 6-Amino-thionicotinamid.

#### 4.) 3-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid

##### eingesetzte Mengen:

|                               |                |
|-------------------------------|----------------|
| 10 g ( $\hat{=}$ 0,096 Mole)  | 3-Cyanopyridin |
| 21 ml ( $\hat{=}$ 0,247 Mole) | Methyljodid    |
| ca. 20 ml                     | Äthanol abs.   |

In einem 50 - 100 ml 1-Halskolben mit Magnetkern und Rückflußkühler mit aufgesetztem Trockenrohr(CaCl<sub>2</sub>) wurde 3-Cyanopyridin (0,096 Mole) in ca. 20 ml abs. Äthanol unter Erwärmen (Wasserbad, 60 - 65° C) gelöst. Danach gibt man die ca. 2 1/2fache Menge Methyljodid (0,247 Mole) zu.

Insgesamt hält man die Lösung 4 Stunden am Rückfluß. Der Kolben war mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Lösung wird darauf am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wird im Exsiccator getrocknet und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 12 g = 50 % der Theorie

Schmelzp.: 194 - 195° C (Literatur: Schmelzp. 198° C,

K. Schenker u. J. Druey, 1959) (201)

| <u>UV:</u> <u>in Wasser</u> |            | <u>0,1 n NaOH/Wasser</u> |            |
|-----------------------------|------------|--------------------------|------------|
| $\lambda$                   | $\epsilon$ | $\lambda$                | $\epsilon$ |
| 267,5                       | 4,14       | 263,5                    | 4,37       |
| 274,5                       | 3,40       | 345,5                    | 4,46       |

IR:

|                           |                               |
|---------------------------|-------------------------------|
| 2940 cm <sup>-1</sup> (s) | C-H Valenz-Schwingungen       |
| 2990 cm <sup>-1</sup> (s) |                               |
| 1490 cm <sup>-1</sup> (m) | C-H Deformations-Schwingungen |
| 1450 cm <sup>-1</sup> (m) |                               |
| 2243 cm <sup>-1</sup> (w) | C $\equiv$ N Valenzschwingung |

#### 5.) 4-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

|           |                                     |
|-----------|-------------------------------------|
| 10 g      | ( $\hat{=}$ 0,096 M) 4-Cyanopyridin |
| 21 ml     | ( $\hat{=}$ 0,247 M) Methyljodid    |
| ca. 50 ml | Äthanol abs.                        |

Verfahren wie beim 3-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid beschrieben. Die Lösung wurde 7 Stunden am Rückfluß gehalten. Der Kolben war mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Nach Trocknung im Exsiccator wurde das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 14 g = 58 % der Theorie

Schmelzp.: 190 - 192° C

6.) 6-Amino-3-cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

500 mg            6-Amino-3-cyanopyridin

4 ml (≅ 9,0 g) Methyljodid

ca. 13 ml        Äthanol abs.

6-Amino-3-cyanopyridin wird in Äthanol abs. gelöst und das Methyljodid zugegeben. Die Lösung wurde insgesamt 7 Stunden am Rückfluß gehalten (Badtemperatur 60 - 65° C), danach am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 330 mg ≅ 30 % der Theorie

Schmelzp.: 231 - 233° C

|                           |         |        |         |
|---------------------------|---------|--------|---------|
| $C_7H_8N_3J$ (MG: 261,06) | C       | H      | N       |
| Ber.:                     | 32,21 % | 3,09 % | 16,1 %  |
| Gef.:                     | 32,02 % | 2,94 % | 15,94 % |

| <u>UV:            in Wasser</u> |            | <u>Wasser/0,1 n NaOH</u> |            |
|---------------------------------|------------|--------------------------|------------|
| $\lambda$                       | $\epsilon$ | $\lambda$                | $\epsilon$ |
| 254                             | 17,54      | 272                      | 22,8       |
| 226                             | 15,05      | 280,5                    | 19,33      |
| 300,5                           | 4,79       | 324                      | 2,65       |

Das UV-Spektrum in 0,1 n HCl ist praktisch identisch mit demjenigen in Wasser.

IR:

2236  $\text{cm}^{-1}$  (s)      - C  $\equiv$  N - Valenzschwingung  
1430  $\text{cm}^{-1}$  (m)      C - H Deformationsschwingung  
1442  $\text{cm}^{-1}$  (w)

7.) Nicotinsäureamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

10 g (0,082 Mole) Nicotinsäureamid  
21 ml (0,247 Mole) Methyljodid  
70 ml Äthanol abs.

Verfahren wie unter 4.) beschrieben. Reaktionszeit  
6 1/2 Stunden. Das Rohprodukt wurde aus Methanol  
(ca. 800 ml) umkristallisiert und im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 15,4 g = 71 % d. Theorie

Schmelzp.: 207 - 208<sup>o</sup> C (Literatur: Schmelzp. 210 - 212<sup>o</sup> C)

UV:                      in Wasser -       $\lambda$  264,6 nm                       $\epsilon$  = 4,197

IR: Hier ist bei 2880  $\text{cm}^{-1}$  (w) eine C - H Valenzschwingung  
zu sehen.

1390  $\text{cm}^{-1}$  (s)      - CH<sub>3</sub> symmetrische Deformationsschwingung  
1460  $\text{cm}^{-1}$  (m), 1440  $\text{cm}^{-1}$  (m)      C - H Deformations-  
schwingung

Die Amid I- (1670  $\text{cm}^{-1}$  (s) ) und Amid-II- (1630  $\text{cm}^{-1}$  (m) )  
Banden sind nicht überlappt.

8.) 6-Amino-nicotinsäureamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

|        |                     |                                 |
|--------|---------------------|---------------------------------|
| 3,0 g  | ( $\pm$ 0,022 Mole) | 6-Amino-nicotinsäureamid (6-AN) |
| 9 g    | ( $\pm$ 0,063 Mole) | Methyljodid                     |
| 140 ml |                     | Methanol p. A.                  |

6-AN wird unter Erwärmen und unter Rühren (Magnetrührer) im Methanol gelöst. Dazu wird die ca. dreifache Menge Methyljodid pipettiert und die Lösung insgesamt 9 Stunden unter Rühren am Rückfluß gehalten (Badtemperatur 60 - 64° C). Der Kolben war mit Aluminiumfolie umwickelt und der Rückflußkühler trug ein Trockenrohr (CaCl<sub>2</sub>). Nach 3 - 4 Stunden begann ein weißer Niederschlag auszufallen. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und im Exsiccator getrocknet.

Rohausbeute: 5,2 g (theoretisch: 6,09 g). Das zeigt, daß die Reaktion nicht vollständig in Richtung der Alkylierung abgelaufen ist.

Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4 g  $\pm$  66 % der Theorie

Schmelzp.: > 300°C

|                                                                |       |      |       |
|----------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O J (MG: 279,08) | C     | H    | N     |
| Ber.:                                                          | 30,13 | 3,61 | 15,06 |
| Gef.:                                                          | 30,00 | 3,34 | 15,15 |

| UV:       |            | in Wasser |  | 0,1 n NaOH/Wasser |            |
|-----------|------------|-----------|--|-------------------|------------|
| $\lambda$ | $\epsilon$ |           |  | $\lambda$         | $\epsilon$ |
| 296       | 5,15       |           |  | 283               | 18,65      |
| 257       | 12,9       |           |  |                   |            |
| 226       | 16,25      |           |  |                   |            |

Das UV-Spektrum in 0,1 n HCl ist mit demjenigen in Wasser identisch.

IR:

|                           |                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1390 $\text{cm}^{-1}$ (m) | - $\text{CH}_3$ symmetrische Deformationsschwingung |
| 1370 $\text{cm}^{-1}$ (m) |                                                     |
| 1438 $\text{cm}^{-1}$ (m) | C - H Deformationsschwingung                        |

Amid I- und Amid II-Banden überlappen. 1660  $\text{cm}^{-1}$  (s)  
und 1640  $\text{cm}^{-1}$  (s).

#### 9.) Darstellung von 6-Amino-nicotinsäurethioamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

|              |                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------|
| 100 mg       | 6-Amino-3-cyanopyridin-N <sup>1</sup> -methyljodid |
| ca. 20 ml    | Pyridin abs.                                       |
| 0,06 ml      | Triäthylamin                                       |
| (± 0,0432 g) |                                                    |

Das Nitril ( $3,83 \cdot 10^{-4}$  Mole) wurde in Pyridin gelöst (2-Halskolben) und Triäthylamin ( $4,2 \cdot 10^{-4}$  Mole) etwa im Verhältnis Mol : Mol zugegeben. Unter Rühren (Magnetrührer) und unter Eiskühlung wird ein stetiger Strom an trockenem  $\text{H}_2\text{S}$  (durch  $\text{CaCl}_2$ -Turm) etwa 2 Stunden eingeleitet.

Man läßt die Lösung 2 Stunden verschlossen bei Zimmer-temperatur stehen und engt sie danach am Rotationsverdampfer bis zur Trockne ein. Es werden noch mehrmals kleine Mengen Methanol zugegeben und ebenfalls zur Trockne eingeeengt. Darauf wird das Produkt in Methanol gelöst und mit Diäthyläther ausgefällt. Man läßt über Nacht im Kühlschrank stehen, saugt die Kristalle ab und wäscht sie mit Äther.

Ausbeute: 100 mg  $\hat{=}$  88,5 % der Theorie

Schmelzp.: 216 - 218° C

| $C_7H_{10}N_3JS$ (MG: 295,14) | C     | H    | N     | S     |
|-------------------------------|-------|------|-------|-------|
| Ber.:                         | 28,49 | 3,42 | 14,24 | 10,86 |
| Gef.:                         | 28,58 | 3,42 | 14,24 | 10,98 |

| <u>UV:</u> in Wasser |            | <u>0,1 n NaOH/Wasser</u> |            |
|----------------------|------------|--------------------------|------------|
| $\lambda$            | $\epsilon$ | $\lambda$                | $\epsilon$ |
| 301                  | 12,05      | 311                      | 10,33      |
| 264                  | 12,31      | 282,3                    | 11,49      |
|                      |            | 274                      | 11,18      |

Das UV-Spektrum in 0,1 n HCl ist mit demjenigen in Wasser identisch.

IR:

|                           |                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1448 $\text{cm}^{-1}$ (m) | C - H Deformationsschwingung                        |
| 1370 $\text{cm}^{-1}$ (w) | - $\text{CH}_3$ symmetrische Deformationsschwingung |

10.) Darstellung von Thionicotinamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

a) durch Schwefelung von Nicotinsäureamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

500 mg Nicotinsäureamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

2 g Phosphorpentasulfid

Nicotinsäureamid-N<sup>1</sup>-methyljodid wurde in einem Porzellanmörser auf 60 - 70° C erwärmt (Heizplatte). Danach wurde das Phosphorpentasulfid zugegeben, und unter kräftigem Druck wurden die beiden Substanzen mit dem Pistill verrieben. Nach ca. 30 Minuten wurde das Gemisch schmierig und färbte sich braun. Das Reaktionsgemisch wurde erschöpfend mit Methanol extrahiert, solange, bis sich das Methanol nicht mehr gelb färbte (ca. 500 ml insgesamt). Die methanolische Lösung wurde filtriert und 1 h mit Papierschnitzeln am Rückfluß gekocht.

Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer etwa auf ein Drittel ihres Volumens eingengt und nach dem Erkalten mit dem gleichen Volumen Diäthyläther versetzt. Das Thionicotinamid-methojodid fiel in ganz feiner Verteilung aus. Es wurde in der Phywe abzentrifugiert und gesammelt.

Zur Reinigung wird es nochmals in Methanol gelöst und mit Diäthyläther ausgefällt.

Ausbeute: 385 mg  $\hat{=}$  69 % der Theorie

Schmelzp.: 194 - 195° C (Literatur: Schmelzp.: 198,5 - 199,5° C,  
S. Shifrin 1963) (46)

b) aus 3-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid

eingesetzte Mengen:

|                              |                                            |
|------------------------------|--------------------------------------------|
| 1,0 g                        | 3-Cyanopyridin-N <sup>1</sup> -methyljodid |
| ( $4,07 \cdot 10^{-3}$ Mole) |                                            |
| ca. 100 ml                   | Pyridin abs.                               |
| 0,6 ml $\hat{=}$ 0,432 g     | Triäthylamin                               |
| ( $4,2 \cdot 10^{-3}$ Mole)  |                                            |

3-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid ( $4,07 \cdot 10^{-3}$  Mole) wird in ca. 100 ml Pyridin abs. eingetragen. Es löste sich nicht vollständig. Dazu wird Triäthylamin ( $4,2 \cdot 10^{-3}$  Mole) pipettiert. Unter Rühren und unter Eiskühlung wird trockenes H<sub>2</sub>S (durch CaCl<sub>2</sub>-Turm) ca. 3 Stunden lang eingeleitet. Beim H<sub>2</sub>S-Einleiten ging das 3-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid vollständig in Lösung.

Die Lösung wurde verschlossen 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Weitere Aufarbeitung wie bei 9.) angegeben.

Das Rohprodukt wurde in Methanol (ca. 200 ml) gelöst; die Lösung auf 50 ml eingeeengt und das Methojodid mit Diäthyläther ausgefällt.

Ausbeute: 800 mg  $\hat{=}$  70,5 % der Theorie

Schmelzp.: 196 - 197° C

Da die UV-Spektren beider Verbindungen gut übereinstimmten, wurde auf eine Elementaranalyse verzichtet, da diese Verbindung von Shifrin beschrieben worden ist.

# 11.) Isonicotinsäurethioamid-N<sup>1</sup>-methyljodid

## eingesetzte Mengen:

1,0 g (4,07 · 10<sup>-3</sup> Mole) 4-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid  
 ca. 100 ml Pyridin abs.  
 0,6 ml (4,2 · 10<sup>-3</sup> Mole) Triäthylamin

Ansatz wie vorstehend beschrieben. Trockenes H<sub>2</sub>S wurde 3 Stunden lang eingeleitet. Die Lösung wurde verschlossen, 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Rohprodukt wurde in Methanol gelöst, die Lösung auf ca. 30 ml eingeeengt und das Methojodid mit Diäthyläther ausgefällt. Orange-farbene Kristalle.  
 Schmelzp.: 197 - 200<sup>o</sup> C.

Ausbeute: 730 mg  $\hat{=}$  64,3 % der Theorie

|                                                               |       |      |       |
|---------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> S J (MG: 280,15) | C     | H    | N     |
| Ber.:                                                         | 30,01 | 3,24 | 10,0  |
| Gef.:                                                         | 30,59 | 3,01 | 10,13 |

| UV: | <u>in Wasser</u> |            | <u>0,1 n HCl/Wasser</u> |  | <u>0,1 n NaOH/Wasser</u> |            |
|-----|------------------|------------|-------------------------|--|--------------------------|------------|
|     | $\lambda$        | $\epsilon$ | $\lambda$               |  | $\lambda$                | $\epsilon$ |
|     | 327              | 3,15       | 327                     |  | 341                      | 1,94       |
|     | 227              | 24,19      | 226,5                   |  | 226                      | 25,0       |

Das UV-Spektrum in 0,1 n HCl/Wasser ist fast identisch mit demjenigen in Wasser.

## 12.) Nicotinsäureselenoamid

### eingesetzte Mengen:

|                |                             |                                                |
|----------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| 8,3 g          |                             | 3-Cyanopyridin                                 |
| 30,0 ml        |                             | Äthanol abs.                                   |
| ca. 80 - 90 ml |                             | Äthanol abs., gesättigt mit $\text{NH}_3$ -Gas |
| 46,6 g         | $\text{Al}_2\text{Se}_3$    | Entwicklungsdauer 60 - 90 Min.                 |
| ca. 130 ml     | 5 n $\text{H}_2\text{SO}_4$ |                                                |

90 ml Äthanol abs. wurden unter Eiskühlung mit  $\text{NH}_3$ -Gas gesättigt. 8,3 g 3-Cyanopyridin wurden bei Zimmertemperatur unter Rühren in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit NS 29 in 30 ml Äthanol abs. gelöst. Dazu wurde das äthanolische Ammoniak gegossen. Es wurde die abgebildete Glasschliff-Apparatur zusammengebaut und ein konstanter Stickstoffstrom

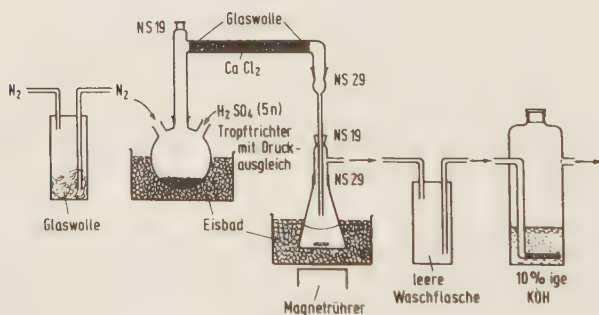


Abb. 31

durch die Apparatur geleitet, um wegen der leichten Oxidierbarkeit und Zersetzlichkeit des Selenwasserstoffs die Luft durch ein inertes Gas zu ersetzen. Die letzte Waschflasche, gefüllt mit 5-10 %iger KOH, war ein guter Anzeiger für den Gasfluß in der Apparatur und deren Dichtigkeit.

Zur Entwicklung des Selenwasserstoffs wurde die 5 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  langsam zum Aluminiumselenid zugetropft. Der Selenwasserstoff wurde getrocknet, indem er über  $\text{CaCl}_2$  geschickt wurde. Er wird nur über die Oberfläche des Reaktionsgemisches im Erlenmeyerkolben geleitet und nicht in die Lösung eingeleitet. Die Reaktionslösung wurde unter Eiskühlung ständig mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt; sie färbte sich rasch dunkelrot. Fast der gesamte Selenwasserstoff wurde in der Reaktionslösung absorbiert, denn die KOH in der letzten Waschflasche färbte sich erst gegen Ende des Einleitungsprozesses rötlich. Nachdem die Selenwasserstoff-Entwicklung beendet war, wurde das Reaktionsgefäß abgenommen und mit einem Glasstopfen verschlossen. Der Stopfen wurde mit Heftpflaster fixiert. Der Erlenmeyerkolben wurde mit Aluminiumfolie umwickelt und bei früheren Ansätzen 5 Tage, später 3 Tage und bei den letzten Chargen nur noch 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Im Reaktionsgefäß setzt sich entweder ein brauner amorpher Niederschlag ab oder es bilden sich orange-gelbe Nadeln. Die überstehende weinrote Lösung soll klar sein (bei beginnender Trübung Aufarbeitung des Ansatzes).

Die ausgefallenen Kristalle werden unter Stickstoff in einer Glasfritte abgesaugt, mit ganz wenig Äthanol abs. gewaschen und sofort in einen Exsiccator gestellt (auf einer Porzellantasche). Der Exsiccator enthält neben Blaugel eine Schale mit Sicapent ( $\text{P}_2\text{O}_5$  auf Trägermaterial, Schuchardt). Der Exsiccator wird mit Hilfe einer Ölpumpe evakuiert und mit dem Nicotinsäureselenoamid über Nacht stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde der Exsiccator mit Stickstoff belüftet. Die Kristalle hatten sich rot verfärbt. Das Rohprodukt wurde nun aus 50 - 60° C-warmem n-Propanol unter Stickstoff umkristallisiert. 160 - 170 ml n-Propanol wurden unter Stickstoff-Atmosphäre auf ca. 60° C erwärmt (Temperaturkontrolle durch Thermometer). Das Nicotinsäureselenoamid wurde durch einen Pulvertrichter zugegeben und unter kräftigem Rühren in Lösung gebracht. Danach wurde die warme Lösung unter Stickstoff durch ein Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben filtriert, der anschließend über Nacht bei -15° C gehalten wird, wobei Kristallisation einsetzte. Der Rückstand wurde nochmals mit ca. 100 ml n-Propanol unter Rühren erwärmt und auch die Lösung wurde nach dem Filtrieren in das Tiefkühlfach gestellt. In den Faltenfiltern blieb elementares Selen in der dunkelgrauen Modifikation zurück.

Am andern Tag wurde das umkristallisierte Nicotinsäureselenoamid auf einer Glasfritte (D 3) unter Stickstoff abgenutscht und die Mutterlaugen in einem 500 ml-Rundkolben gesammelt.

Die vereinigten Mutterlaugen wurden am Rotationsverdampfer (Badtemperatur ca. 40° C) weitgehend eingeeengt und zur erneuten Kristallisation bei -15° C stehen gelassen. Das auf diese Weise gewonnene Selenonicotinamid fiel in schönen gold-gelben Nadeln an. Sie wurden im Exsiccator über Blaugel getrocknet.

Die gesamte Menge (ca. 3,2 g) an umkristallisiertem Selenoamid wurde unter Stickstoff mit einem langstieligen Trichter in braune Ampullen (32) abgefüllt. Die Ampullen wurden nochmals für ca. 2 Stunden im evakuierten Exsiccator aufbewahrt und nach Belüften des Exsiccators mit Stickstoff rasch zugeschmolzen und bei -20° C aufbewahrt. (Es ist mindestens 10 Monate unzersetzt haltbar.)

Anmerkungen: Es wurden bei diesem Präparat ausschließlich Glasspatel verwendet. Die Exsiccatoren wurden immer mit Stickstoff belüftet.

Ausbeute: 3,274 g = 22,2 % der Theorie

Schmelzp.: 228 - 232° C (unter Zers., zugeschmolzenes Röhrchen)

| C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> Se (MG: 185,09) | C    | H    | N     | Se   |
|--------------------------------------------------------------|------|------|-------|------|
| Ber.:                                                        | 38,9 | 3,27 | 15,1  | 43   |
| Gef.:                                                        | 38,7 | 3,31 | 14,67 | 43,9 |

| UV: in Wasser |       | 0,1 n HCl/Wasser |       | 0,1 n NaOH/Wasser |      |
|---------------|-------|------------------|-------|-------------------|------|
| λ             | ε     | λ                | ε     | λ                 | ε    |
| 327           | 6,58  | 331              | 5,59  | 264               | 4,44 |
| 227           | 12,62 | 352              | 7,16  |                   |      |
|               |       | 223              | 10,21 |                   |      |

IR-Spektrum des Nicotinsäurethioamids:

3240 (s) - 3050 (s) + 3020 (s) - 2960 (w) - 2810 (m) -  
 2575 (w) - 1675 (s) - 1587 (s) + 1575 (m, sh) - 1467 (m)  
 + 1455 (s) - 1400 (s) - 1330 (w) + 1326 (w) - 1312 (vs) -  
 1185 (s) - 1149 (s) - 1124 (m) - 1106 (m) - 1085 (w) -  
 1039 (s) - 1030 (s) + 1025 (s) - 988 (w) + 984 (w) -  
 956 (w) - 925 (m) - 913 (vs) - 805 (s) - 765 (m) - 735 (s) -  
 708 (s) + 700 (s) - 644 (w) - 630 (s) - 532 (w) + 528 (w) -  
 485 (m) - 410 (w) - 378 (s).

IR-Spektrum des Nicotinsäureselenoamids:

3200 (s) - 3015 (s) + 2940 (s) - 2800 (m) - 2540 (w) -  
1675 (s) - 1582 (s) + 1565 (m) - 1465 (m) + 1454 (s) -  
1397 (s) - 1318 (w) - 1295 (w) + 1280 (w) - 1178 (m) -  
1143 (m) - 1115 (m) - 1092 (w) - 1030 (m) - 1022 (m)  
+ 1018 (s) - 975 (w) - 948 (w) - 922 (w) - 860 (vs) -  
835 (w) - 798 (m) + 775 (m) - 705 (m) + 700 (m) + 688 (s) -  
625 (m) - 603 (w) - 495 (w) - 415 (m) - 400 (w) - 367 (s).

Das IR-Spektrum des Selenoamids hat große Ähnlichkeit mit demjenigen des Thioamids. (vgl. S. 81 und S. 84)

Im IR-Spektrum des Thionicotinamids treten jedoch folgende intensive Banden auf, die im Spektrum des Selenonicotinamids ganz fehlen oder nur wenig intensiv sind: 1312, 1149, 913 und 700 + 708 Schulter. Umgekehrt findet sich im Spektrum des Selenoamids bei  $860\text{ cm}^{-1}$  eine intensive Bande, die beim Thioamid nicht auftritt.

13.) Versuch der Darstellung eines Nicotinsäureselenoamid-N<sup>1</sup>-methyl-  
jodids

eingesetzte Mengen:

|                                    |                                            |
|------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1,0 g ( $4,07 \cdot 10^{-3}$ Mole) | 3-Cyanopyridin-N <sup>1</sup> -methyljodid |
| ca. 100 ml                         | Pyridin abs.                               |
| 0,6 ml $\hat{=}$ 0,432             | Triäthylamin                               |
| ( $4,2 \cdot 10^{-3}$ Mole)        |                                            |

|        |                             |                           |
|--------|-----------------------------|---------------------------|
| 50 g   | $\text{Al}_2\text{Se}_3$    | Entwicklungsdauer 1 3/4 h |
| 140 ml | 5 n $\text{H}_2\text{SO}_4$ |                           |

Als Reaktionsgefäß diente ein 200 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff. 3-Cyanopyridin-N<sup>1</sup>-methyljodid wird in ca. 100 ml Pyridin abs. eingetragen. Es löste sich nicht vollständig. Dazu wird Triäthylamin im Verhältnis Mol / Mol pipettiert. Unter Rühren und Eiskühlung wird trockener H<sub>2</sub>Se ca. 1 3/4 Stunde lang eingeleitet. (Die Schwefelsäure wurde ganz langsam zum Al<sub>2</sub>Se<sub>3</sub> zugetropft.) Die Apparatur und das Verfahren ist bei der Darstellung des Selenonicotinamids beschrieben.

Das Reaktionsgemisch wurde verschlossen einige Stunden (ca. 3 - 4) bei Zimmertemperatur stehen gelassen und danach am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Es wurden mehrmals kleine Mengen Methanol (ca. 20 ml) in den Kolben gegeben und erneut bis zur Trockne eingengt. Danach wurde der feste Rückstand in ca. 40 ml heißem Wasser aufgenommen und unter Stickstoff in einen Kolben filtriert. Das violett-rot gefärbte Filtrat wurde gefriergetrocknet.

Von dem gefriergetrockneten Rückstand wurden Proben im Vakuum eingeschmolzen.

#### Analyse:

| C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> J Se (MG:327,04) | C    | H   | N   | J     | Se   |
|---------------------------------------------------------------|------|-----|-----|-------|------|
| Ber.:                                                         | 26   | 3   | 9   | 38    | 24   |
| Gef.:                                                         | 28,9 | 6,1 | 6,5 | 51,43 | 2,75 |

#### 14.) Versuch der Darstellung eines Nicotinsäuretelluramids (MG: 104,11)

#### eingesetzte Mengen:

8,0 g      3-Cyanopyridin

|            |                                           |                               |
|------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| 30,0 ml    | abs. Äthanol                              |                               |
| 80,0 ml    | Äthanol, gesättigt mit $\text{NH}_3$ -Gas |                               |
| 46 g       | $\text{Al}_2\text{Te}_3$                  | Entwicklungsdauer ca. 60 Min. |
| ca. 115 ml | 5 n $\text{H}_2\text{SO}_4$               |                               |

Als Reaktionsgefäß diente ein 200 ml-Erlenmeyerkolben mit NS 29. Es wurde genauso gearbeitet wie bei der Darstellung des Selenonicotinamids.

Zur Zerstörung des Tellurwasserstoffs wurde in der letzten Waschflasche 10 %ige KOH verwendet.

Die Reaktionslösung war nur schwach karminrot gefärbt. Sie blieb unter Lichtausschluß 5 Tage verschlossen bei Zimmertemperatur stehen. Es war nach dieser Zeit kein Niederschlag ausgefallen. Danach wurde die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Sowie die Lösung mit Luft in Berührung kam verschwand die rötliche Farbe und es fiel ein schwarzer Niederschlag - wahrscheinlich elementares Tellur - aus. Nach der Trocknung konnten nur farblose Nadeln - vermutlich 3-Cyanopyridin - festgestellt werden.

#### 15.) Versuch der Darstellung eines Isonicotinsäureselenoamids

##### eingesetzte Mengen:

|            |                                                 |                               |
|------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|
| 8,0 g      | 4-Cyanopyridin                                  |                               |
| 30,0 ml    | Äthanol, abs.                                   |                               |
| 80,0 ml    | abs. Äthanol, mit $\text{NH}_3$ -Gas gesättigt. |                               |
| ca. 50 g   | $\text{Al}_2\text{Te}_3$                        | Entwicklungsdauer ca. 60 Min. |
| ca. 120 ml | 5 n $\text{H}_2\text{SO}_4$                     |                               |

Als Reaktionsgefäß diente ein 200 ml Erlenmeyerkolben mit NS 29. 4-Cyanopyridin (8,0 g) löste sich nur schlecht in abs. Äthanol bei Zimmertemperatur. Es wurde vom ungelösten 4-Cyanopyridin abdekantiert. In Lösung waren nur ca. 2 - 3 g gegangen. Im übrigen wurde genauso gearbeitet wie bei der Darstellung des Selenonicotinamids.

Schon gegen Ende des Einleitens des  $H_2Se$  waren dunkelbraune, voluminöse Kristalle ausgefallen. Der Reaktionsansatz wurde deshalb schon am nächsten Tag weiterverarbeitet. Die gewonnenen braunen Kristalle konnten weder in Methanol, Äthanol noch in Wasser gelöst werden ohne Abscheidung von rotem Selen. Beim Ansäuern trat  $H_2Se$ -Geruch auf! Es wurde ein UV-Spektrum geschrieben, das im sauren und alkalischen ein durchgehendes Plateau von 295  $m\mu$  bis 360  $m\mu$  aufweist. Bei einer Wellenlänge  $\lambda > 360 m\mu$  war kein Maximum festzustellen, wie es bei einem Isonicotinsäureselenoamid erwartet werden konnte aufgrund des bathochromen shifts.

#### 16.) Benzoessäureselenoamid

##### eingesetzte Mengen:

|                         |                                         |
|-------------------------|-----------------------------------------|
| 10 ml ( $\hat{=}$ 10 g) | Benzonitril                             |
| 30,0 ml                 | Äthanol abs.                            |
| ca. 80 ml               | Äthanol abs., gesättigt mit $NH_3$ -Gas |

|        |               |                              |
|--------|---------------|------------------------------|
| 47 g   | $Al_2Se_3$    | Entwicklungsdauer 90 Minuten |
| 130 ml | 5 n $H_2SO_4$ |                              |

Als Reaktionsgefäß diente ein 200 ml-Erlenmeyerkolben. Es wurde völlig analog zu der Darstellung des Seleno-nicotinamids gearbeitet.

Die Reaktionslösung färbte sich noch während des  $H_2Se$ -Überleitens dunkelorange. Nach ca. 3 Stunden war sie dunkelorange gefärbt. Das Reaktionsgefäß blieb 3 Tage verschlossen bei Zimmertemperatur stehen. Es fiel kein Niederschlag aus. Darauf wurde die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Im Kolben blieb ein gelber Rückstand, der sich jedoch bei Luftzutritt braun verfärbte und feucht wurde. Das Benzoesäureselenoamid löste sich nicht in heißem Wasser - im Gegensatz zum Nicotinsäureselenoamid. Das Rohprodukt wurde aus warmem n-Propanol umkristallisiert und im Exsiccator über Blaugel getrocknet. Die so erhaltenen Kristalle - denen immer noch ein Benzonitril-Geruch anhaftete - wurden in Glasampullen eingeschmolzen (vgl. Nicotinsäureselenoamid). Das so erhaltene Produkt wurde bei  $-15^{\circ}C$  gelagert. Es zersetzte sich jedoch nach 2 Monaten.

Da Benzoesäureselenoamid bereits beschrieben worden ist, wurde auf eine Elementaranalyse verzichtet.

| UV: | in Wasser  | 0,1 n HCl/Wasser | 0,1 n NaOH/<br>Wasser |
|-----|------------|------------------|-----------------------|
|     | $\lambda$  | $\lambda$        | $\lambda$             |
|     | 226        | 226,5            | 262,5                 |
|     | 230,5      | 230,5            | 269,5                 |
|     | (282 Min.) | (282 Min.)       | 277,5                 |
|     | 322,5      | 324              |                       |

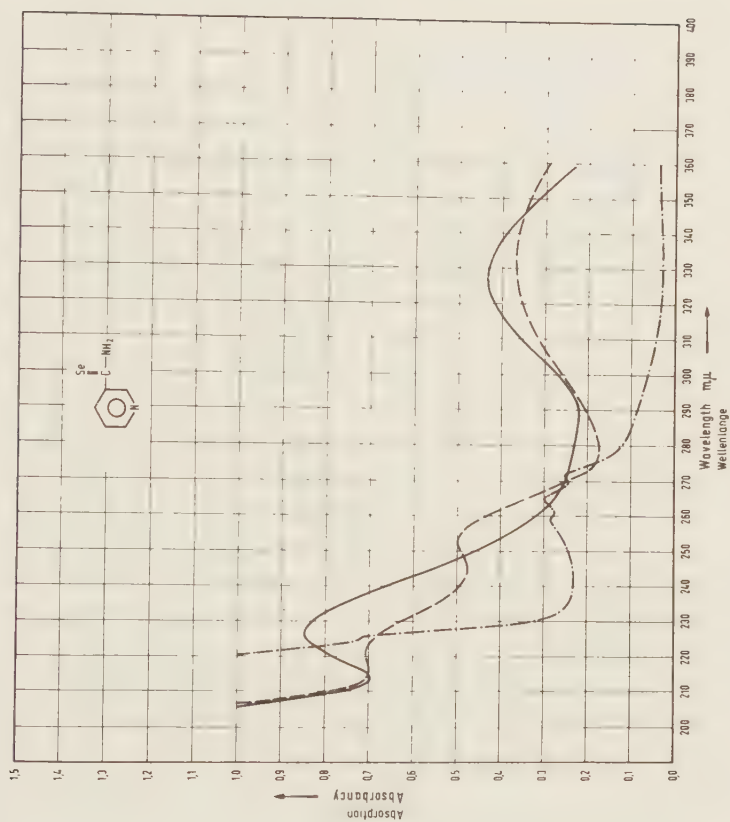


Abb. 32: Spektrum von Nicotinsäureselenoamid

- in Wasser, pH 5.6
- - - in 0,01 n HCl
- ... in 0,01 n NaOH

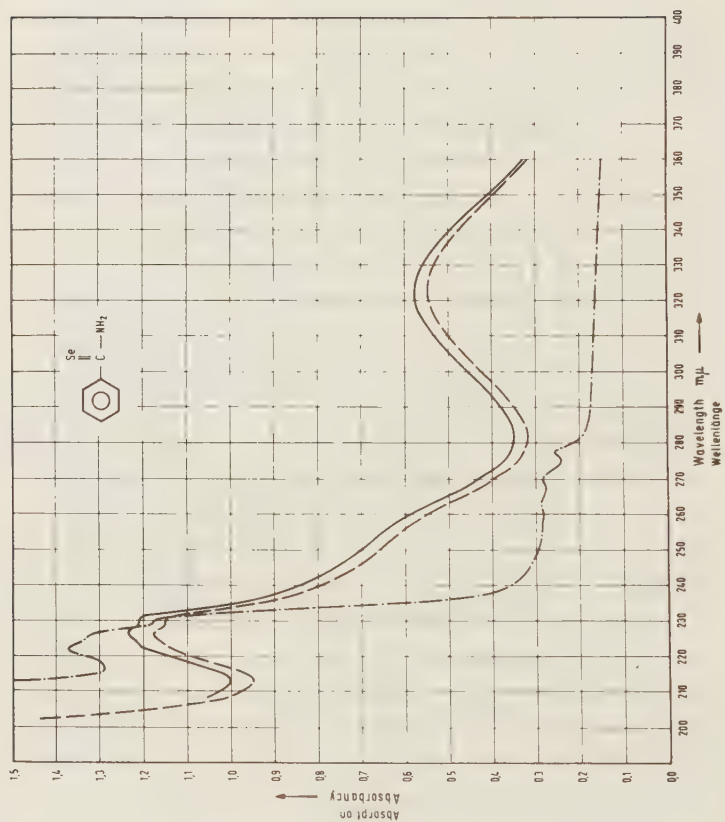


Abb. 33: Spektrum von Benzoesäureselenoamid

- in Wasser pH 5.6
- in 0,01 n HCl
- · - · in 0,01 n NaOH

UV-Spektrum des Benzonitrils in Wasser:

$\lambda$  max 264, 270, 278

Auch hier findet - wie beim Nicotinsäureselenoamid - im Alkalischen offensichtlich eine Zersetzung unter Rückbildung des Ausgangsproduktes statt.

Die  $\text{>C} = \text{Se}$ -Gruppe scheint ein Chromopher zu sein, das gekoppelt mit einem aromatischen Ring (Benzol, Pyridin) zu einem Absorptionsmaximum im Bereich von 323 nm (Benzoessäureselenoamid) bis 327 nm (Nicotinsäureselenoamid) führt. (vgl. Abb. 32 und 33)

17.) Nicotinamid-N-oxid

eingesetzte Mengen:

|       |                         |                                 |
|-------|-------------------------|---------------------------------|
| 5,0 g | ( $\hat{=}$ 0,041 Mole) | Nicotinamid                     |
| 8 ml  | ( $\hat{=}$ 0,069 Mole) | 30 %iges $\text{H}_2\text{O}_2$ |
| 50 ml |                         | Eisessig                        |

Ein Gemisch von 5 g Nicotinamid, 8 ml 30 %igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 50 ml Eisessig wurde 4 Stunden lang auf dem Wasserbad erhitzt. Danach wurden 100 ml Wasser zugegeben und das verdünnte Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Es wurden darauf noch dreimal kleine Mengen Wasser (je ca. 20 - 25 ml) zugegeben und erneut zur Trockne eingengt.

Der feste, bräunlich gefärbte Rückstand wurde in ca. 20 ml kochendem Wasser gelöst, filtriert und zum Filtrat 5 ml Äthanol abs. zugegeben. In der Kälte fielen weiße, voluminöse Kristalle aus.

Ausbeute: bis zu 4,4 g = 78 % der Theorie

Schmelzp.: 290 - 291<sup>0</sup> C unter Zers. (Literatur: Schmelzpunkt 291 - 293<sup>0</sup> C unter Zers.) (158)

UV: in Wasser:  $\lambda$  max 259 nm,  $\epsilon$  = 10,8

( $\lambda$  min = 236 nm). Die Spektren in 0,1 n HCl und 0,1 n NaOH sind fast identisch mit demjenigen in Wasser.

IR: 1235 (s)  $N^+ - O^-$ - Streckschwingung (140, 143)  
(nach Ochial bei Pyridin-1-Oxiden im Bereich um 1200 - 1300).

NMR: NMR-Lösungsmittel: Wasser - gut; Eisessig - etwas;  
Chloroform - schlecht.

|       |      |             |        |
|-------|------|-------------|--------|
| H - 2 | 8,71 | $J_{2,4}$ = | 1,5 Hz |
| H - 4 | 8,06 | $J_{2,6}$ = | 2 "    |
| H - 5 | 7,72 | $J_{4,5}$ = | 8 "    |
| H - 6 | 8,47 | $J_{4,6}$ = | 1 "    |
|       |      | $J_{5,6}$ = | 6,5 "  |

### 18.) 3-Cyanopyridin-N-oxid

#### eingesetzte Mengen:

|         |                            |
|---------|----------------------------|
| 3,0 g   | 3-Cyanopyridin             |
| 7,8 ml  | Trifluoressigsäureanhydrid |
| 1,23 ml | 30 %iges $H_2O_2$          |
| 30 ml   | Dichlormethan              |

7,8 ml Trifluoressigsäureanhydrid werden unter Rühren (Magnetrührer) und unter Eiskühlung zu einer Suspension von 1,23 ml 30 %igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 30 ml Dichlormethan hinzugeben.

Nach 5 Minuten wird das Kühlbad entfernt und 3 g 3-Cyanopyridin werden innerhalb 30 Minuten zugegeben. Danach wird 1 Stunde am Rückfluß erhitzt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen.

Die Lösung wurde darauf am Rotationsverdampfer soweit wie möglich eingengt. Bei einem Restvolumen von ca. 5 ml destilliert nichts mehr ab. Es werden dazu 10 ml Wasser hinzugegeben und die Lösung mit festem  $\text{NaHCO}_3$  neutralisiert.

Darauf wurde erneut am Rotationsverdampfer soweit wie möglich eingengt. Es fiel ein weißer Niederschlag aus (wahrscheinlich Natriumsalz der Trifluoressigsäure), der abfiltriert wurde.

Das Filtrat wurde mit ca. 30 ml Methanol versetzt. Die milchige methanolische Lösung wurde erneut filtriert und der Niederschlag mit Methanol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden soweit wie möglich am Rotationsverdampfer eingengt.

Zum öligen Rückstand wurden ca. 20 ml Dichlormethan hinzugegeben und die Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur mittels eines Magnetrührers gerührt. Danach wurde die Dichlormethan-Phase abgetrennt und eingedampft. Es schieden sich weiße Kristalle ab.

Dünnschichtchromatographische Prüfung des Produktes auf Kieselgel HF<sub>254</sub>; 0,25 mm stark.

Fließsystem: FM 2

Es zeigten sich im UV 3 Flecke mit folgenden  $R_F$ -Werten:  
0.84 ; 0.41 und 0.09.

Der Fleck mit  $R_F = 0.84$  ist wahrscheinlich unverändertes  
3-Cyanopyridin (Vergleichsubstanz:  $R_F = 0.89$ ).

Die Substanz mit dem  $R_F = 0.09$  konnte nicht identifiziert  
werden und die Bande mit dem  $R_F = 0.41$  enthielt das er-  
wartete 3-Cyanopyridin-N-oxid.

#### Versuch der Reinigung des 3-Cyanopyridin-N-oxids mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie

Das Rohprodukt wurde in Methylenchlorid gelöst und auf insge-  
samt 5 Dünnschichtplatten, 20 x 20 cm, 1 mm dick beschichtet  
mit Kieselgel  $HF_{254}$  aufgetragen. Die Platten wurden einmal  
im System FM 2 entwickelt.

Die Banden mit  $R_F = 0.41$  wurden abgekratzt, das Kieselgel  
auf 5 Schliffzentrifugengläser ( $v = 50$  ml) verteilt und je 20 ml  
Methanol zugegeben. In einer mechanischen, rotierenden  
Schüttelvorrichtung (Eigenbau) wurden die verschlossenen Gläser  
20 Minuten geschüttelt, um das 3-Cyanopyridin-N-oxid aus  
dem Kieselgel zu extrahieren. Danach wurde das Kieselgel mit  
Hilfe einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Methanol  
abfiltriert. Diese Prozedur wurde noch dreimal wiederholt.

Die vereinigten methanolischen Lösungen wurden am Rotations-  
verdampfer bis zur Trockne eingedampft. Neben weißen Kri-  
stallen war auch Kieselgel zu sehen. Der Rückstand wurde in  
9 ml Methanol aufgenommen und in der Ultrazentrifuge (Spinco)  
30 Minuten bei 20.000 U/Min. = 45.000 g zentrifugiert. Der  
Überstand wurde zur Trockne eingeeengt; es fielen gelbliche  
bis braune Kristalle an. Diese wurden in ca. 5 ml Essig-  
säureäthylester in der Hitze gelöst und die heiße Lösung

filtriert (es blieb ein violetter Rückstand im Filter zurück). Das Filtrat wurde auf etwa 2 ml eingeeengt, bis Kristalle auszufallen begannen. Zur weiteren Kristallisation wurde das Kölbchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die so gewonnenen Kristalle wurden im Exsiccator unter Vakuum über Kieselgel bei Zimmertemperatur getrocknet.

Das auf die beschriebene Weise gewonnene "3-Cyanopyridin-N-oxid" wurde dünnschichtchromatographisch im System FM 2 auf seine Reinheit geprüft. Es zeigte sich wieder ein Fleck mit  $R_F = 0,09$ . Die N-oxid-Bande wurde abgeschabt und nach Eluieren erneut dünnschichtchromatographisch analysiert. Es zeigte sich wieder ein Fleck kurz über der Startlinie. Auch die Elementaranalyse ergab nicht die theoretisch berechneten Werte.

Aus dem NMR-Spektrum ging hervor, daß die gewonnene Substanz nicht einheitlich war, sondern ein Gemisch aus 3-Cyanopyridin-N-oxid und Nicotinamid-N-oxid im ungefähren Verhältnis 6 : 4 darstellt.

Dieses Gemisch wurde direkt zur Synthese des Nicotinsäurethioamid-N-oxids eingesetzt.

#### 19.) Nicotinsäurethioamid-N-oxid

##### eingesetzte Mengen:

|        |    |                         |
|--------|----|-------------------------|
| 100    | mg | "3-Cyanopyridin-N-oxid" |
| 0,11   | ml | Triäthylamin            |
| ca. 25 | ml | Pyridin abs.            |

"3-Cyanopyridin-N-oxid" wurde in Pyridin abs. gelöst und das Triäthylamin zupipettiert. Unter Eiskühlung und unter Rühren (Magnetrührer) wird 2 Stunden lang  $\text{H}_2\text{S}$  (über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet) eingeleitet. Danach wird das Reaktionsgefäß verschlossen und weitere 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darauf wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Es wurden noch mehrmals kleine Mengen Methanol zugegeben und ebenfalls zur Trockne eingedampft. Im Kolben blieb ein gelber Rückstand. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 63 mg

Schmelzpunkt: 135 - 142° C

| $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{SO}$ (MG: 154,18) | C     | H    | N     | S     | O     |
|--------------------------------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|
| Ber. :                                                 | 46,74 | 3,92 | 18,17 | 20,80 | 10,38 |
| Gef. :                                                 | 46,32 | 3,80 | 17,83 | 20,42 | 10,80 |

| UV: | <u>in Wasser</u> |            | <u>0,1 n NaOH / Wasser</u> |            |
|-----|------------------|------------|----------------------------|------------|
|     | $\lambda$        | $\epsilon$ | $\lambda$                  | $\epsilon$ |
|     | 263,5            | 12,39      | 257                        | 11,64      |
|     | 229              | 19,04      | 221                        | 23,44      |

Das Spektrum in 0,1 n HCl ist fast identisch mit demjenigen in Wasser.

IR: 1215 (vs) - 1230 (s) -  $\text{N}^+-\text{O}^-$ -Streckschwingung, im Bereich 1200 - 1300  $\text{cm}^{-1}$  ist im IR-Spektrum des Nicotinsäure-thioamids keine Absorptionsbande vorhanden. (vgl. S. 81 )

NMR: Zur Aufnahme eines NMR-Spektrums reichte die Löslichkeit in Wasser nicht aus.

Massenspektrum: Probe enthält Schwefel (Ionen bei 256 ( $S_8$ ), 224 ( $S_7$ ), 192 ( $S_6$ ), 160 ( $S_5$ )).  
Ferner intensive Ionen bei 154 (Molekulargewicht), 138 (  ), 154 -  $NH_2$ ), 120 ( $154 - H_2S$ ), 105, 93, 78, 77, 65, 64, 60, 52, 51, 50.

## 20.) Nicotinsäurethioamid-S-oxid

### eingesetzte Mengen:

|                                |                   |
|--------------------------------|-------------------|
| 2,75 g ( $\approx$ 0,025 Mole) | Thionicotinamid   |
| 20 ml                          | Pyridin abs.      |
| 3,75 ml                        | 30 %iges $H_2O_2$ |

Als Reaktionsgefäß diente ein 3-Halskolben, der mit einem Schlifftthermometer zur Kontrolle der Temperatur der Reaktionslösung ausgerüstet war. Thionicotinamid wurde in Pyridin abs. unter Erwärmen (Wasserbad) und unter Rühren (Magnetrührer) gelöst.

Die Lösung wurde auf  $+30^\circ C$  abgekühlt. 3,75 ml Perhydrol wurden tropfenweise so zugegeben, daß die Temperatur  $60^\circ$  nicht überschritt. Danach läßt man die Temperatur auf  $+30^\circ C$  absinken. Die Lösung wurde einige Zeit in ein Eisbad gestellt; es setzte jedoch keine spontane Kristallisation ein (auch nicht nach Kratzen mit einem Glasstab). Das Reaktionsgemisch wurde in einen anderen Kolben gegossen und nach Kratzen an der Wand setzte Kristallisation ein, die im Tiefkühlschrank vervollständigt wurde.

Die Kristalle wurden auf einer Glasfritte abgenutscht und zweimal mit je 1 ml Pyridin und anschließend noch zweimal mit je 1 ml Wasser gewaschen.

Das Rohprodukt wurde noch zweimal aus je 9 - 10 ml Pyridin umkristallisiert.

Ausbeute: 1,13 g = 37 % der Theorie

Schmelzpunkt: 130 - 131° C (aus Pyridin) (Literatur:

Schmelzp. 132 - 134° C) (135)

Das Thionicotinamid-S-oxid war chromatographisch rein (DC auf Kieselgel HF<sub>254</sub>, Merck, im System FM 5;

R<sub>F</sub> = 0,50 - 0,51).

Der Versuch, aus der Mutterlauge weiteres Thionicotinamid-S-oxid zu gewinnen, mißlang. Die Mutterlauge wurde unter Vakuum vorsichtig am Rotationsverdampfer (Badtemperatur +22° C) eingeengt. Es schieden sich weitere Kristalle ab. Danach blieb der Kolben ca. 5 Minuten an der Luft bei Zimmertemperatur stehen. Plötzlich lösten sich die Kristalle unter starkem Erwärmen der Lösung - die sich braun färbte - auf.

#### 21.) 6-Amino-nicotinsäurethioamid-S-oxid

##### eingesetzte Mengen:

|       |    |                                        |
|-------|----|----------------------------------------|
| 200   | mg | 6-Amino-thionicotinamid                |
| 1,64  | ml | Pyridin abs.                           |
| 0,247 | ml | 30 %iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

Es wurde völlig analog zur Synthese des Thionicotinamid-S-oxids gearbeitet. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt war, setzte - nach Kratzen an der Wand - Kristallisation ein. Die Kristalle wurden abgenutscht und mit wenig Pyridin gewaschen. Das Rohprodukt enthielt noch wenig 6-Amino-thionicotinamid - es wurde einmal aus Pyridin umkristallisiert.

Ausbeute: 60 mg = 27 % der Theorie

Schmelzpunkt: 147° C

| $C_6H_7N_3O S$ (MG: 169,21) | C     | H    | N     | S     |
|-----------------------------|-------|------|-------|-------|
| Ber.:                       | 42,59 | 4,17 | 24,83 | 18,95 |
| Gef.:                       | 42,26 | 4,05 | 24,05 | 18,95 |

Das 6-Amino-thionicotinamid-S-oxid war chromatographisch rein (DC auf Kieselgel HF<sub>254</sub>, Merck, im System FM 5).

| UV: | <u>in Wasser</u> |            | <u>0,1 n HCl/Wasser</u> |            | <u>0,1 n NaOH/Wasser</u> |            |
|-----|------------------|------------|-------------------------|------------|--------------------------|------------|
|     | $\lambda$        | $\epsilon$ | $\lambda$               | $\epsilon$ | $\lambda$                | $\epsilon$ |
|     | 336              | 11,11      | 322                     | 9,63       | 264,5                    | 13,3       |
|     | 283              | 10,49      | 264                     | 10,18      |                          |            |

IR: Die Zuordnung einer Absorptionsbande im Bereich

1060 - 1040 (s) einer  $\text{>S} = \text{O}$ -Schwingung erscheint fraglich, da zumindest im Spektrum des Nicotinsäurethioamid in diesem Bereich intensivere Banden auftreten als im IR-Spektrum des zugehörigen S-Oxids.

Im Spektrum des 6-Amino-nicotinsäurethioamid-S-oxids ist bei 1050  $\text{cm}^{-1}$  eine relativ schwache Bande zu sehen, die im Spektrum des 6-Amino-nicotinsäurethioamids fehlt.

22.) 6-Amino-nicotinamid-N-oxid

eingesetzte Mengen:

|                             |                     |
|-----------------------------|---------------------|
| 2,0 g ( $\pm$ 0,0146 Mole)  | 6-Amino-nicotinamid |
| 17,7 ml                     | Eisessig            |
| 2,86 ml ( $\pm$ 0,025 Mole) | 30 %iges $H_2O_2$   |

Ein Gemisch von 6-Amino-nicotinamid,  $H_2O_2$  und Eisessig wurde 4 Stunden lang auf dem Wasserbad erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt war, wurden 35 ml Wasser zugegeben und die verdünnte Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Es wurden danach noch 2 - 3mal kleine Mengen Wasser zugegeben und erneut zur Trockne eingengt (bis der Geruch nach Essigsäure verschwunden war). Der feste Rückstand wurde aus ca. 15 ml Wasser in Gegenwart von Aktivkohle umkristallisiert. Die Kristalle wurden im Vakuumexsiccator getrocknet. Die Verbindung kristallisiert mit 1 Mol Kristallwasser, das auch in der Trockenkapsel (ca.  $65^{\circ}C$ ) im Vakuum nicht zu entfernen ist. Es wurde je eine Analyse vorher und nachher gemacht; beide waren identisch.

Ausbeute: 1,3 g = 52 % der Theorie

Schmelzpunkt:  $> 280^{\circ}C$  (konnte nicht bestimmt werden).

Die Reinheit der Substanz wurde durch analytische DC an Kieselgel  $HF_{254}$  (0,25 mm stark) im Fließmittelsystem FM 1 geprüft.



(MG: 171,14)

|        | C     | H    | N     | O     |
|--------|-------|------|-------|-------|
| Ber. : | 42,11 | 5,30 | 24,55 | 28,05 |
| Gef. : | 42,06 | 5,26 | 24,55 | 27,23 |

| UV: | in Wasser |            | 0,1 n HCl / Wasser |            |
|-----|-----------|------------|--------------------|------------|
|     | $\lambda$ | $\epsilon$ | $\lambda$          | $\epsilon$ |
|     | 312       | 3,99       |                    |            |
|     | 276       | 10,93      | 262                | 10,19      |
|     | 233       | 26,93      | 233,5              | 14,45      |

Das Spektrum in 0,1 n NaOH/Wasser ist fast identisch mit demjenigen in Wasser.

IR: Im Bereich 1200 - 1300 sind 2 Banden zu sehen: 1212 (s) - 1272 (m).

Die intensive Bande bei  $1212 \text{ cm}^{-1}$  fehlt im IR-Spektrum des 6-Amino-nicotinamids und kann der  $\text{N}^+\text{-O}^-$ -Streckschwingung zugeordnet werden.

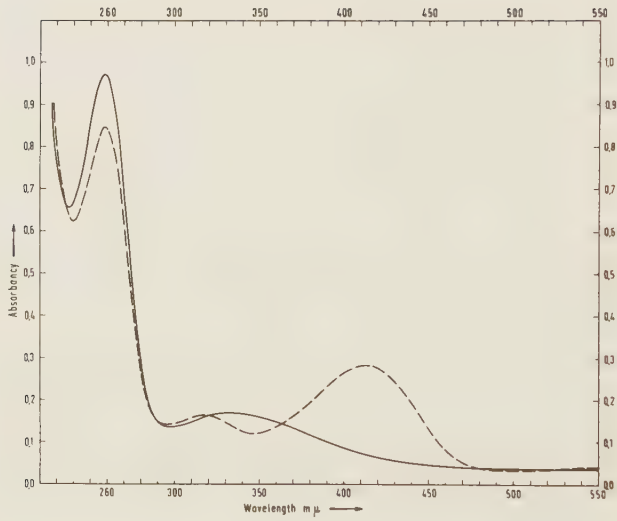


Abb. 34: Spektrum von Seleno-NADP<sup>+</sup>

—— Seleno-NADP ox., pH 7.4

----- Seleno-NADP red. (Glucose-6-phosphat-DH)

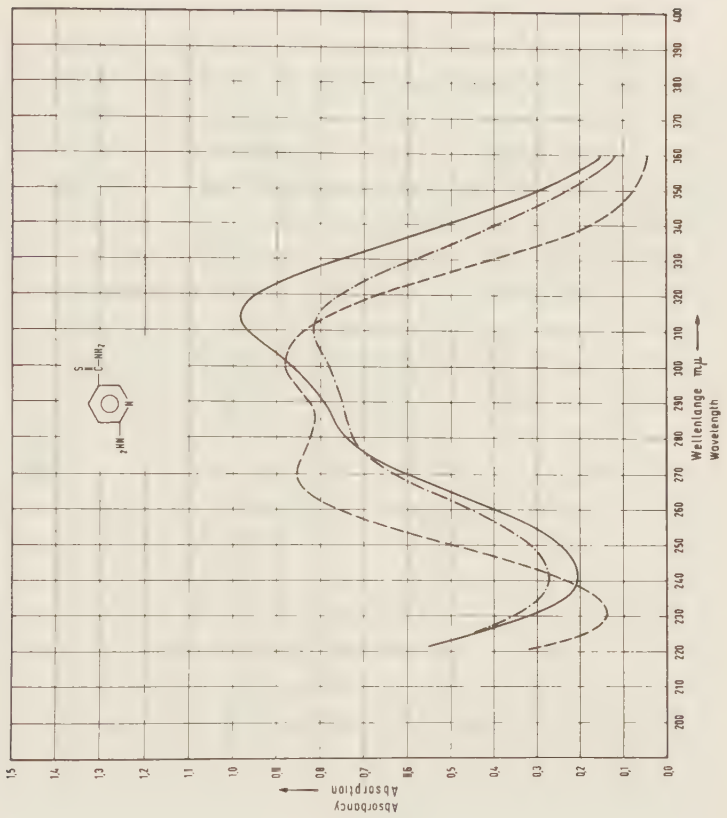


Abb. 35: Spektrum von 6-Amino-nicotinsäurethioamid

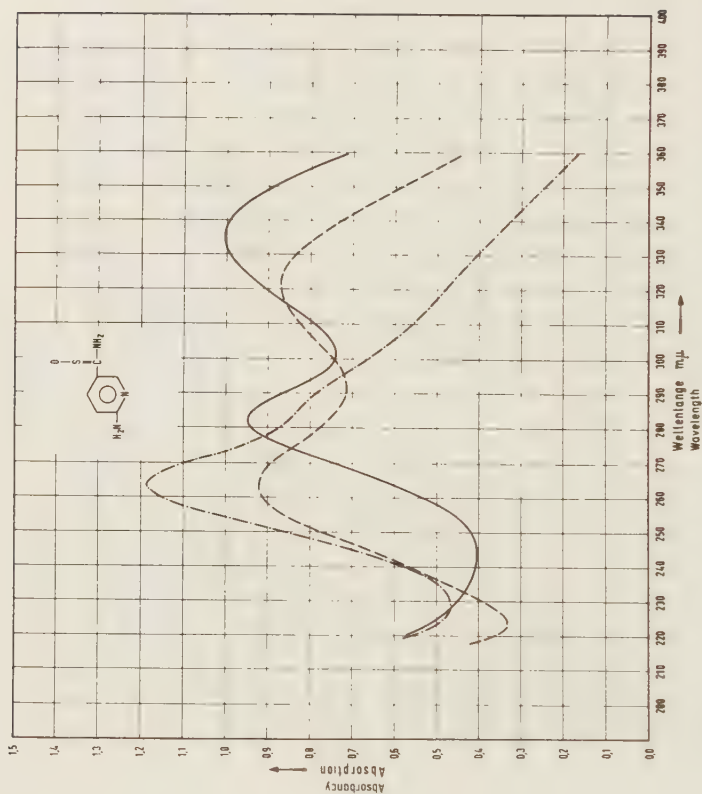


Abb. 36: Spektrum von 6-Amino-nicotinsäurethioamid-S-oxid

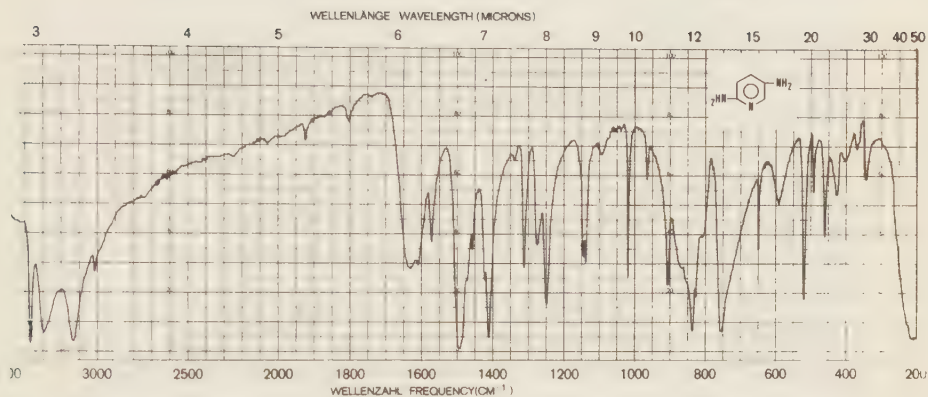


Abb. 37: Infrarotspektrum des 2.5-Diaminopyridins

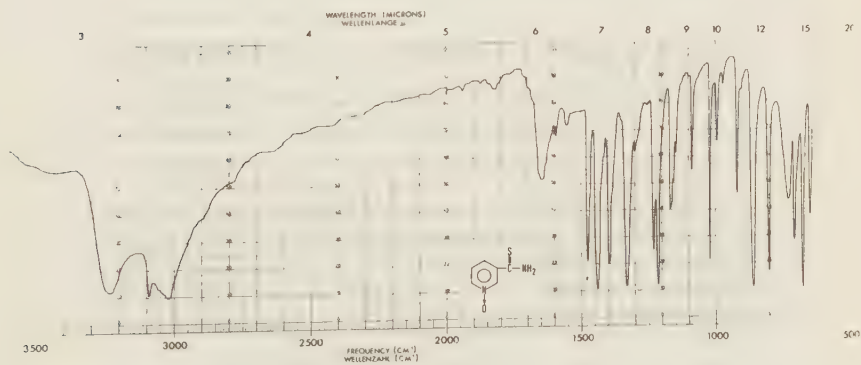


Abb. 38: Infrarotspektrum des Nicotinsäurethioamid-N-oxids

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthese, der Stoffwechsel sowie Eigenschaften von schwefel- und selenhaltigen Nicotinsäureamid-Antimetaboliten und  $\text{NADP}^+$ -Analoge beschrieben.

Darüber hinaus gelang die Synthese einiger  $\text{N}^1$ -Methylpyridinium-Verbindungen als Coenzym-Modell-Substanzen.

An ihnen ließ sich die Hydrierbarkeit in verschiedenen Puffern gut studieren.

Mit Nicotinsäurethioamid und -selenoamid wurde auch die in vivo-Synthese von  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge untersucht.

Enzymkinetische Untersuchungen dienten zur Klärung der Frage, inwieweit Thio- $\text{NADP}^+$  und Seleno- $\text{NADP}^+$  in  $\text{NADP}^+$ -bedürftigen enzymatischen Reaktionen im Vergleich mit  $\text{NADP}^+$  als Cofaktor wirksam sind.

- 1.) Unter den Nicotinsäureamid-Antimetaboliten ist die Synthese des 6-Amino-nicotinsäurethioamids sowie des Nicotinsäureselenoamids - zweier Verbindungen mit unerwarteten pharmakologischen Eigenschaften - hervorzuheben. Die Darstellung eines Nicotinsäure-telluramids ist nicht gelungen.

In den Infrarotspektren von Nicotinsäureselenoamid und Benzoesäureselenoamid konnte keine Se-H-Valenzschwingungsbande entdeckt werden, so daß eine Onamid/Olimid-Tautomerie, wie sie früher für die Pyridincarbonsäurethioamide behauptet wurde, unwahrscheinlich ist.

- 2.) 6-Amino-nicotinsäureamid (6-AN) ist ein sehr toxischer Antimetabolit des Nicotinamids. Wird in diesem Molekül der Sauerstoff in der Carbonamid-Gruppe durch Schwefel ersetzt, so ist die Toxizität der Verbindung ganz erheblich vermindert.

Nicotinsäurethioamid ist praktisch ungiftig, obwohl bei der Ratte in der Leber und im Gehirn unphysiologische  $\text{NAD(P)}^+$ -Analoge gebildet werden. Dagegen ist Nicotinsäureselenoamid ein sehr toxischer Nicotinamid-Antimetabolit. Bei intraperitonealer Verabreichung liegt die  $\text{DL}_{100}$  bei der Ratte bei ca. 10 mg/kg.

Nach Gabe von Nicotinsäurethioamid und auch nach 6-Amino-nicotinsäurethioamid treten im Rattenurin die entsprechenden S-Oxide als Stoffwechselprodukte auf.

- 3.) Von Nicotinsäureselenoamid und Isonicotinsäurethioamid sowie vom Pyridin-3-carbaldehyd wurden erstmals  $\text{NADP}^+$ -Analoge hergestellt und deren Eigenschaften in enzymatischen Reaktionen getestet.
  - 4.) Mit Ausnahme der Glucose-6-phosphat-DH aus Hefe und Rattenhirn werden Thio- $\text{NADP}^+$  und Seleno- $\text{NADP}^+$  durch alle untersuchten Dehydrogenasen [6-Phospho-gluconat-DH (Hefe), Isocitrat-DH (Herzmuskel, Rattenhirn), Glutathion-Reduktase (Hefe, Rattenhirn), malic enzyme (Rattenhirn), L-Xylulose-Reduktase (Taubenleber) und Alkohol-Dehydrogenase (Pferdeleber)] langsamer (bzw. nicht mehr) reduziert als das natürliche Coenzym. Eine fortschreitende Abnahme in der Reaktionsgeschwindigkeit kann in der Reihe  $\text{NADP}^+ > \text{Thio-NADP}^+ > \text{Seleno-NADP}^+$  beobachtet werden. Dies könnte eine Folge des geringeren positivierenden induktiven Effektes sein, den die Carbonsäurethioamid- bzw. -selenoamid-Gruppe im Vergleich zur Carbonamid-Gruppe auf das C-Atom 4 des Nicotinamid-Moleküls ausübt.
- Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei den Reaktionen, die von Dehydrogenasen katalysiert werden, die Seleno- $\text{NADP(H)}$  als Coenzym akzeptieren der Wasserstoff mit B-Stereospezifität auf den Nicotinamid-Ring des  $\text{NADP}^+$  über-

tragen wird.

Keines der bisher untersuchten Enzyme mit A-Stereospezifität reagierte mit Seleno-NADP<sup>+</sup>.

- 5.) Die Substrat-Spezifität der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm wurde für 3-AcPyrADP<sup>+</sup>, 3-OHCPyrADP<sup>+</sup>, Thio-NADP<sup>+</sup> und Seleno-NADP<sup>+</sup> untersucht. Als Vergleichssubstrat diente NADP<sup>+</sup>. Thio-NADP<sup>+</sup>, 3-AcPyrADP<sup>+</sup> und 3-OHCPyrADP<sup>+</sup> werden durch die alkalische Phosphatase in die entsprechenden NAD<sup>+</sup>-Analoge umgewandelt, Seleno-NADP<sup>+</sup> dagegen nicht.

VIII.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Euler, H. v., H. Albers, F. Schlenk: Chemische Untersuchungen an hochgereinigter Co-Zymase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 240, (1936),  
113 - 126
- 2.) Adler, E., H. Hellström, H. v. Euler: Zur Kenntnis der Reduktion der Co-Zymase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 242, (1936),  
225 - 249
- 3.) Warburg, O., W. Christian: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. (Pyridin-Nucleotide).  
Biochem. Z. 287, (1936), 291 - 328
- 4.) Warburg, O., W. Christian, A. Griesse: Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise.  
Biochem. Z. 282, (1935), 157
- 5.) Euler, H. v., E. Adler, H. Hellström: Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. XII. Mechanismus der Dehydrierung von Alkohol und Triosephosphaten und der Oxydoreduktion.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 241, (1936),  
239 - 272
- 6.) Schlenk, F., H. v. Euler: Cozymase.  
Naturwissenschaften 24, (1936), 794 - 795

- 7.) Myrbäck, K.: Zur Kenntnis der Cozymase. XI. Über die Natur der reduzierenden Gruppe der Co-Zymase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 241, (1936),  
223 - 232
- 8.) Euler, H., H. Albers, F. Schlenk: Über die Co-Zymase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 237, (1935),  
I - II
- 9.) Euler, H. v., R. Vestin: Zur Kenntnis der Wirkungen der Co-Zymase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 237, (1935),  
1 - 7
- 10.) Ichiyama, A., S. Nakamura, Y. Nishizuka: Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) in Mammals and its Regulatory Mechanism.  
Arzneim.-Forsch. 17, (1967), I, 1346 - 1355  
Arzneim.-Forsch. 17, (1967), II, 1525 - 1530
- 11.) Deguchi, T., A. Ichiyama, Y. Nishizuka, O. Hayaishi: Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide-Adenine dinucleotide in the Brain.  
Biochim. Biophys. Acta 158, (1968), 382 - 393
- 12.) Wang, T.P., N.O. Kaplan, F.E. Stolzenbach: Enzymatic Preparation of Triphosphopyridine Nucleotide from Diphosphopyridine Nucleotide.  
J. biol. Chem. 211, (1954), 465 - 472
- 13.) Wang, T.P., N.O. Kaplan: Kinases for the Synthesis of Coenzyme A and Triphosphopyridine Nucleotide.  
J. biol. Chem. 206, (1954), 311 - 325

- 14.) Apps, D.K.: Kinetic Studies of Pigeon Liver NAD-Kinase.  
European J. Biochem. 5, (1968), 444 - 450
- 15.) Fernandes, M.: Properties of Rat Brain NAD-Kinase.  
J. Neurochem. 17, (1970), 503 - 509
- 16.) Zatman, L.J., N.O. Kaplan, S.P. Colowick: Inhibition  
of spleen Diphosphopyridine nucleotidase by  
nicotinamide, an exchange reaction.  
J. biol. Chem. 200, (1953), 197 - 212
- 17.) Jacobson, K.B., N.O. Kaplan: Distribution of Enzymes  
Cleaving Pyridine Nucleotides in Animal Tissues.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, (1957), 31 - 43
- 18.) Kaplan, N.O.: The Pyridine Coenzymes - in "The Enzymes"  
Eds. P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck  
- Übersichtsarbeit -  
Vol. 3, 105 - 169 (Chapter 12), Academic Press,  
New York and London (1960)
- 19.) Kaplan, N.O.: Analogs of Pyridine Coenzymes - in  
"Proceedings of the Fifth International Congress  
of Biochemistry Moscow 1961". General Editor  
N.M. Sissakian  
- Übersichtsarbeit -  
Vol. 4, 295 - 309 (Ed. P.A.E. Desnuelle),  
Pergamon Press, Oxford, London, New York,  
Paris (1963)
- 20.) Johnson, W.J.: in "Metabolic Inhibitors", Vol. 2,  
- Übersichtsarbeit - Dinucleotide Analogues and  
related Substances.  
Eds. R.M. Hochster and J.H. Quastel, Chapter 16,  
1 - 21, Academic Press, New York a. London (1963)

- 21.) Colowick, S.P., J. van Eys, J.H. Park: Dehydrogenation  
in "Comprehensive Biochemistry", Eds. M.  
Florkin and E.H. Stotz, Vol. 14, 1 - 97  
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London,  
New York (1966)  
- Übersichtsarbeit -
- 22.) Coper, H.: Stoffwechselstörungen durch Antimetaboliten des  
Nicotinamids - in "B-Vitamine - Klinische und  
Physiologisch-chemische Probleme" S. 275 - 291  
- Übersichtsarbeit -  
Herausg. H. von Kress und K.U. Blum  
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart, (1966)
- 23a) Chaykin, S., M. Dagani, L. Johnson, M. Samli: The  
Fate of Nicotinamide in the Mouse. Urinary  
Metabolites.  
J. biol. Chem. 240, (1965), 932 - 938
- 23b) Chaykin, S., M. Dagani, L. Johnson, M. Samli,  
J. Battaile: The Fate of Nicotinamide in the Mouse.  
Tissue Metabolites.  
Biochim. Biophys. Acta 100, (1965), 351 - 365
- 24.) Petrack, B., P. Greengard, H. Kalinsky: On the  
relative efficacy of Nicotinamide and Nicotinic  
Acid as Precursors of Nicotinamide Adenine  
Dinucleotide.  
J. biol. Chem. 241, (1966), 2367 - 2372
- 25.) Greengard, P., B. Petrack, H. Kalinsky: Effect of  
Hypophysectomy on Pyridine Nucleotide Metabolism.  
The Role of Nicotinamide.  
J. biol. Chem. 242, (1967), 152 - 154

- 26.) Lee, Y.C., R.K. Gholson: Isolation and Identification of two new nicotinamide metabolites.  
J. biol. Chem. 244, (1969), 3277 - 3282
- 27.) Price, J.M., R.R. Brown, N. Yess: Testing the functional capacity of the Tryptophan-Niacin Pathway in Man by Analysis of Urinary Metabolites.  
Advances in metabolic disorders 2, (1965), 159 - 225
- 28.) Price, J.M., N. Yess, R.R. Brown, St. A.M. Johnson: Tryptophan Metabolism.  
Archives of Dermatology 95, (1967), 462 - 472
- 29.) Price, J.M.: The Determination of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in human urine.  
J. biol. Chem. 211, (1954), 117 - 124
- 30.) Rose, D.P., R.R. Brown, J.M. Price: Metabolism of Tryptophan to Nicotinic Acid Derivatives by Women taking Oestrogen-Progestogen Preparations.  
Nature 219, (1968), 1259 - 1260
- 31.) Hoffer, A.: Biochemistry of Nicotinic Acid and Nicotinamide.  
Psychosomatics 8, (1967), 95 - 100
- 32.) Veit, J.: Zur Toxikologie und Pharmakologie des 3-Acetylpyridins bei Ratten.  
Med. Diss., Freie Universität Berlin (1965)
- 33.) Zatman, L.J., N.O. Kaplan, S.P. Colowick, M.M. Ciotti: The Isolation and properties of the Isonicotinic Acid Hydrazide Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide.  
J. biol. Chem. 209, (1954), 467 - 484

- 34.) Anderson, B.M., C.J. Ciotti, N.O. Kaplan: Chemical Properties of 3-substituted pyridine analogues of diphosphopyridine nucleotide.  
J. biol. Chem. 234, (1959), 1219 - 1225
- 35.) Walter, P., N.O. Kaplan: Substituted Nicotinamide Analogues of Nicotinamide Adenine Dinucleotide.  
J. biol. Chem. 238, (1963), 2823 - 2830
- 36.) Brunnemann, A., H. Coper, D. Neubert: Biosynthese und Wirkung des 6-Amino-nicotinamid-adenin-dinucleotids (6-ANAD).  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 246, (1964), 437 - 451
- 37.) Dietrich, L.S., I.M. Friedland, L.A. Kaplan: Pyridine nucleotide metabolism: Mechanism of Action of the Niacin Antagonist, 6-Aminonicotinamide.  
J. biol. Chem. 233, (1958), 964 - 968
- 38.) Ciotti, M.M., St. R. Humphreys, J.M. Venditti, N.O. Kaplan, A. Goldin: The antileukemic action of two thiadiazole derivatives.  
Cancer Res. 20, (1960), 1195 - 1201
- 39.) Ciotti, M.M., N.O. Kaplan, A. Goldin, J.M. Venditti: Mechanism of the antileukemic and antinicotinamide action of thiadiazoles.  
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, (1958), 287
- 40.) Pauling, L.: Die Natur der Chemischen Bindung, pp. 85, 89, 213, 217  
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1962)

- 41.) Karrer, P., J. Schukri: Über einige Verbindungen  
mit verketteten Thiazol-, Phenyl- und Pyridin-  
ringen.  
Helv. Chim. Acta 28, (1945), 820 - 824
- 42.) Rist, N.: Bull. Union Internat. Tbc 28, (1958),  
208 - 216
- 43.) Rist, N., F. Grumbach, D. Libermann: Amer. Rev.  
Tbc 79, (1959), 1 - 5
- 42.) und 43.) zitiert nach: (p. 129)
- 44.) Kakimoto, S., J. Seydel, E. Wempe: Zusammenhänge  
zwischen Struktur und Wirkung bei Carbothion-  
amiden.  
Arzneim.-Forsch. 12, (1962), 127 - 133
- 45.) Cahn, R.D., N.O. Kaplan, L. Levine, E. Zwilling:  
Nature and development of lactic dehydrogenases.  
Science 136, (1962), 962 - 969
- 46.) Shifrin, S.: Coenzyme Analogs.  
I. Preparation and Properties of Thionicotin-  
amide Methiodide,  
Biochim. Biophys. Acta 69, (1963), 1 - 8
- 47.) Shifrin, S.: Coenzyme Analogs.  
II. Photochemical Inactivation of reduced  
Thionicotinamide Adenine Dinucleotide.  
Biochim. Biophys. Acta 69, (1963), 9 - 17

- 48.) Christ, W.: Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des Thionicotinamids (Thio-NA) und seiner NAD(P)-Analogen.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 260, (1968), 102
- 49.) Brunnemann, A., H. Coper, H. Herken: Isolierung von 3-Acetylpyridin-adenindinucleotid (3-APAD) aus dem Gehirn 3-Acetylpyridin-vergifteter Ratten.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 244, (1962), 223 - 236
- 50.) Brunnemann, A., H. Coper, H. Herken: Biosynthese von 3-Acetylpyridin-adenindinucleotidphosphat (3-APADP) aus Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP).  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 245, (1963), 541 - 550
- 51.) Brunnemann, A., H. Coper, D. Neubert: Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamid-adenindinucleotids (6-ANAD).  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 246, (1964), 437 - 451
- 52.) Coper, H., H. Hadass, H. Lison: Untersuchungen zum Mechanismus zentralnervöser Funktionsstörungen durch 6-Aminonicotinamid.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 255, (1966), 97 - 106

- 53.) Herrath, D. v.: Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Gluconeogenese und auf das Hypophysen-Nebennierenrinden-System. Med. Diss., Freie Universität Berlin (1968)
- 54.) Lison, H.: Untersuchungen zur Differenzierung der durch 6-Aminonicotinamid, einem Antimetaboliten des Nicotinamids, hervorgerufenen zentralnervösen Funktionsstörungen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 267, (1970), 155 - 169
- 55.) Schneider, H.: Institut für Neuropathologie der Freien Universität Berlin  
- Persönliche Mitteilung -
- 56.) Kaplan, N.O., A. Goldin, St. R. Humphreys, M.M. Ciotti, J.M. Venditti: Significance of enzymatically catalyzed exchange reactions in Chemotherapy. Science 120, (1954), 437 - 440
- 57.) Woolley, D.W.: Antimetabolites of the water-soluble Vitamins - in "Metabolic Inhibitors", Vol. 1, Chapter 12, 445 - 475  
Academic Press, New York, London (1963),  
Eds. R. M. Hochster, J. H. Quastel
- 58.) Christ, W., H. Coper: Properties of Selenonicotinamide-Adenine-Dinucleotide Phosphate, an Analogue of NADP. FEBS Letters 2, (1969), 267 - 269

- 59a) Christ, W., D. Schmidt, H. Coper: Comparison of Thio-NADP<sup>+</sup> and Seleno-NADP<sup>+</sup> in NADP<sup>+</sup>-dependent Oxidoreductases.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, (1970), 427 - 434
- 59b) Christ, W., D. Schmidt, H. Coper: Versuche zur enzymatischen Dephosphorylierung von NADP-Analogen durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, (1970), 803 - 808
- 60.) Morselli, P.L., S. Garattini, F. Marcucci, E. Mussini, W. Rewersky, L. Valzelli, R.A. Peters: The effect of injections of fluorocitrate into the brains of rats.  
Biochem. Pharmacol. 17, (1968), 195 - 202
- 61.) Siebert, G.: Citrat und Isocitrat. Bestimmung mit Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase - in H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse".  
Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstraße (1962), 318 - 323
- 62.) Costello, L.C., John J. O'Neill: A simplified and sensitive method for citrate determination in biological samples.  
J. Applied Physiology 27, (1969), 120 - 122

- 63.) Dagley, S.: Determination of Citric Acid by Means of Citrate Lyase. - in "Methods in Enzymology", Vol. XIII, 517 - 518.  
Eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan,  
Academic Press, New York and London (1969)
- 64.) Williamson, J.R., B.E. Corkey: Assays of intermediates of Citric Acid Cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. in "Methods in Enzymology", Vol. XIII, 445  
Eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan,  
Academic Press, New York and London (1969)
- 65.) Palmer, I.S., R.P. Gunsalus, A.W. Halverson, O.E. Olson: Trimethylselenonium Ion as a general excretory product from selenium metabolism in the Rat.  
Biochim. Biophys. Acta 208, (1970),  
260 - 266
- 66.) Wallenfels, K.: The Mechanism of Hydrogen Transfer with pyridine nucleotides.  
in "Steric Course of Microbiological Reactions." Ciba Foundation Study Group, No. 2,  
Eds. G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor J. and A. Churchill Ltd., London (1959)  
10 - 36

- 67.) Sund, H., H. Diekmann, K. Wallenfels: Die Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden - in "Advances in Enzymology", Vol. 26, 115 - 191, Editor: F.F. Nord Interscience Publishers, New York, London, Sydney (1964)
- 68a) Schabarek, A.: Untersuchungen über die Reaktion von Pyridin-, Piperidin-, Piperazin-, Phenazin-, Phenthiazin-, Chinolin- und Acridinverbindungen mit der NAD(P)-Glycohydrolase. Ein Beitrag zur enzymatischen Synthese von NAD(P)-Analogen. Naturwiss. Diss., Freie Universität Berlin, 1967
- 68b) Coper, H., A. Schabarek: Enzymatischer Austausch von 5-Fluornicotinamid gegen Nikotinamid in Pyridinnucleotiden. Naturwiss. 53, (1966), 225
- 69.) Fawcett, C.P., N.O. Kaplan: Preparation and Properties of some Nicotinamide Adenine Dinucleotide Analogues with Pentose and Purine Modifications. J. biol. Chem. 237, (1962), 1709 - 1715
- 70a) Woenckhaus, Ch., R. Jeck: Nicotinamid-2',3'-didesoxy-ribofuranosyl-adenosin-pyrophosphat. Liebig's Ann. Chem. 736, (1970), 126 - 133
- 70b) Woenckhaus, Ch., M. Volz, G. Pfeleiderer: Darstellung und Eigenschaften von Nicotinamid-N<sup>1</sup>-β-D-glucopyranosylphosphat und Nikotinamid-glucosid-Adenin-Dinucleotid. Z. Naturforschg. 19b, (1964), 467 - 470

- 71a) Pflleiderer, G., Ch. Woenckhaus, K. Scholz: NAD-Analogue mit substituiertem Purin-Teil.  
Angew. Chem. 75, (1963), 92
- 71b) Pflleiderer, G., Ch. Woenckhaus, K. Scholz, H. Feller: Nicotinamid-Mercaptopurin-, Nicotinamid-Methylmercaptopurin- und Nicotinamid-Purin-Dinucleotid.  
Liebigs Ann. Chem. 675, (1964), 205 - 212
- 71c) Woenckhaus, Ch.: Synthesen und biochemische Eigenschaften Wasserstoffübertragender Coenzymmodelle.  
Chem. Ber. 97, (1964), 2439 - 2446
- 71d) Woenckhaus, Ch., G. Pflleiderer: Biochemische Eigenschaften der Coenzymanaloga Nicotinamidpurin-dinucleotid, Nicotinamid-1-desazapurin-dinucleotid und Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid.  
Biochem. Z. 341, (1965), 495 - 501
- 72.) Alivisatos, S.G.A., L. La Mantia: Resistance to acid hydrolysis of N-ribosyl-Derivatives of various substituted imidazoles and pyrimidine imidazoles (purines).  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2, (1960), 164 - 168
- 73a) Alivisatos, S.G.A., F. Ungar, L. Luckas, L. La Mantia: Imidazolytic Processes. III. Enzymic Conversion of Coenzyme I to a Histamine Dinucleotide.  
J. biol. Chem. 235, (1960), 1742 - 1750
- 73b) Alivisatos, S.G.A.: Enzymatic interactions of histamine with pyridine coenzymes.  
Federation Proc. 24, (1965), 769 - 773

- 73c) Alivisatos, S.G.A.: Mechanism of action of Diphosphopyridine Nucleotidases.  
Nature 183, (1959), 1034 - 1037
- 74.) Alivisatos, S.G.A., D.W. Wooley: Formation of a new Dinucleotide from Cozymase by enzymic Destruction of the "Onium" Linkage.  
J. Am. Chem. Soc. 77, (1955), 1065 - 1066
- 75.) Eys, J. van, N.O. Kaplan: The Addition of Sulfhydryl Compounds to Diphosphopyridine Nucleotide and its Analogues.  
J. biol. Chem. 228, (1957), 305 - 314
- 76.) Pfeleiderer, G., E. Sann, A. Stock: Zum Wirkungsmechanismus der Dehydrogenasen. Das Reaktionsverhalten von Pyridinnucleotiden (PN) und PN-Modellen mit Sulfit als nucleophilem Agens.  
Chem. Ber. 93, (1960), 3083 - 3099
- 77.) Shuster, L., N.O. Kaplan: The preparation and properties of 3'-Triphosphopyridine Nucleotide.  
J. biol. Chem. 215, (1955), 183 - 194
- 78.) Tochikura, T., M. Kuwahara, S. Komatsubara, M. Fujisaki, A. Suga, K. Ogata: Metabolism of Pyridine Coenzymes in Microorganisms. Part I. Phosphorylation of NAD by a New Phosphotransferring System.  
Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 33, (1969), 840 - 847

- 79.) Tochikura, T., M. Kuwahara, T. Tachiki, S. Komatsubara, K. Ogata: Metabolism of Pyridine Coenzymes in Microorganisms.  
Part II. Chemical Structure of an NADP-Analog.  
Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 33, (1969), 848 - 859
- 80.) Kuwahara, M., T. Tachiki, T. Tochikura, K. Ogata: Metabolism of Pyridine Coenzymes in Microorganisms.  
Part III. Phosphorylation of NADP and NADP-Analog.  
Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 34, (1970), 983 - 990
- 81.) Anderson, B.M., N.O. Kaplan: Enzymatic studies with Analogues of DPN.  
J. biol. Chem. 234, (1959), 1226 - 1232
- 82.) Coper, H., D. Neubert: Reaktionsgeschwindigkeit NADP-abhängiger Oxydoreduktasen aus Ratten-gehirn mit 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat.  
J. Neurochem. 10, (1963), 513 - 522
- 83.) Coper, H., D. Neubert: Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen.  
Biochim. Biophys. Acta 89, (1964), 23 - 32
- 84.) Brunnemann, A., H. Coper, H. Herken: Biosynthese von 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotidphosphat aus NADP.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 245, (1963), 541 - 550

- 85.) Neubert, D., H. Coper: Die Geschwindigkeit der  
"malic enzyme-Reaktion" in Gegenwart von  
NADP-Analoga.  
Biochem. Z. 341, (1965), 485 - 494
- 86.) Glaser, L., D.H. Brown: Purification and Properties  
of D-Glucose-6-phosphate Dehydrogenase.  
J. biol. Chem. 216, (1955), 67 - 79
- 87.) Langan, T.A.: Changes in the Fluorescence Spectrum  
of Reduced Triphosphopyridine Nucleotide on  
Binding to Isocitric Dehydrogenase.  
Acta chem. Scand. 14, (1960), 936 - 938
- 88.) Barman, Th. E.: Enzyme Handbook, Vol. I, 68,  
Springer Verlag, Berlin (1969)
- 89.) Mavis, R.D., E. Stellwagen: Purification and Subunit  
Structure of Glutathione Reductase from Baker's  
Yeast.  
J. biol. Chem. 243, (1968), 809 - 814
- 90.) Pullman, M.E., S.P. Colowick, N.O. Kaplan:  
Comparison of Diphosphopyridine Nucleotide with  
its Deaminated Derivative in various Enzyme  
Systems.  
J. biol. Chem. 194, (1952), 593 - 602
- 91.) Pfeleiderer, G., E. Sann, F. Ortanderl: Zum Wirkungs-  
mechanismus von Dehydrogenasen. V. Über die  
Bedeutung des Adenosin-diphosphatrestes im  
Nicotinamid-adenin-dinucleotid.  
Biochim. Biophys. Acta 73, (1963), 39 - 49

- 92.) Vennesland, B.: The Pyridine Nucleotides in Biological Oxidations.  
Proc. Fifth Int. Congress of Biochemistry,  
Moscow 1961, Vol. V, p. 38 (Edited by E.C.  
Slater), Pergamon Press, Oxford (1963)
- 93.) Chaykin, S., L. Meissner: The Borohydride reduction products of DPN.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, (1964),  
233 - 240
- 94.) Chaykin, S., L. King, J.G. Watson: The reduction of  $DPN^+$  and  $TPN^+$  with Sodium Borohydride.  
Biochim. Biophys. Acta 124, (1966), 13 - 25
- 95.) Chaykin, S., K. Chakraverty, L. King, J.G. Watson: Tritium-labeled  $DPN^+$  and  $TPN^+$ .  
Biochim. Biophys. Acta 124, (1966), 1 - 12
- 96.) Marks, P.A., A. Szeinberg, J. Banks: Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase of normal and mutant human subjects.  
J. biol. Chem. 236, 10 - 17 (1961)
- 97.) Vennesland, B., F.H. Westheimer in: "The Mechanism of Enzyme Action", p. 357  
Eds. W.D. McElroy, B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore (1954)
- 98.) Levy, H.R., B. Vennesland: The stereospecificity of enzymatic hydrogen transfer from Diphosphopyridine Nucleotide.  
J. biol. Chem. 228, (1957), 85 - 96

- 99.) Cornforth, J.W., G. Ryback, G. Popják, C. Donninger, G. Schroepfer, jr.: Stereo-chemistry of Enzymic Hydrogen Transfer to Pyridine Nucleotides.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, (1962), 371 - 375
- 100.) Nakamoto, T., B. Vennesland: The Enzymatic Transfer of Hydrogen.  
VIII. The reactions catalyzed by glutamic and isocitric dehydrogenases.  
J. biol. Chem. 235, (1960), 202 - 204
- 101.) Stern, B.K., B. Vennesland: The Enzymatic Transfer of Hydrogen.  
IX. The reactions catalyzed by glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phosphogluconic Dehydrogenase.  
J. biol. Chem. 235, (1960), 205 - 208
- 102.) --- : The stereospecificity of glutathione Reductase for Pyridine Nucleotides.  
J. biol. Chem. 235, (1960), 209 - 212
- 103.) Morton, R.K.: The Substrate Specificity and Inhibition of Alkaline Phosphatases of Cow's Milk and Calf Intestinal Mucosa.  
Biochem. J. 61, (1955), 232 - 240
- 104.) --- : The Action of Purified Alkaline Phosphatases on Di- and Tri-Phosphopyridine Nucleotides.  
Biochem. J. 61, (1955), 240 - 244

- 105.) Fernley, H.N., P.G. Walker: Studies on Alkaline Phosphatase.  
Biochem. J. 104, (1967), 1011-1018
- 106.) Moss, D.W., R.H. Eaton, J.K. Smith, L.G. Whitby: Association of Inorganic-Pyrophosphatase Activity with Human Alkaline-Phosphatase Preparations.  
Biochem. J. 102, (1967), 53 - 57
- 107.) Kaplan, N.O., M.M. Ciotti, F.E. Stolzenbach: Chemistry and Properties of the 3-Acetylpyridine analogue of Diphosphopyridine Nucleotide.  
J. biol. Chem. 221, (1956), 823 - 833
- 108.) Biellmann, J.F., M.J. Jung: Preparation and Properties of 3-Cyanopyridine AD<sup>+</sup>, a new Analogue of NAD<sup>+</sup>.  
FEBS Letters 7, (1970), 199 - 200
- 109.) Lange, K., H. Kolbe, K. Keller, H. Herken: Der Kohlenhydratstoffwechsel des Gehirns nach Blockade des Pentose-Phosphat-Weges durch 6-AN.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, (1970), 1241 - 1252
- 110.) Wallenfels, K., H. Schüly: Zum Mechanismus der Reduktion von Pyridiniumsalzen mit Natriumdithionit.  
Angew. Chem. 70, (1958), 471

- 111.) Caughey, W. S., K. A. Schellenberg: NMR confirmation of the Structure of the Adduct formed from a DPN Model and Dithionite.  
Federation Proc. 23, (1964), 479
- 112.) Wallenfels, K., H. Schüly: Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden.  
XIII. Mechanismus der Reduktion von Pyridiniumsalzen mit Natriumdithionit.  
Liebigs Ann. Chem. 621, (1959), 178 - 187
- 113.) Woenckhaus, Ch., P. Zumpe: Umwandlung des  $\alpha$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotids in das  $\beta$ -Isomere.  
Biochem. Z. 343, (1965), 326 - 328
- 114.) Kaplan, N. O., R. H. Sarma: The Structure of Pyridine Coenzymes as related to Binding in: "Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases", 39 - 56  
Edited by H. Sund, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970)
- 115.) Sarma, R. H., V. Ross, N. O. Kaplan: Investigation of the Conformation of  $\beta$ -Diphosphopyridine Nucleotide ( $\beta$ -Nicotinamide-Adenine Dinucleotide) and Pyridine Dinucleotide Analogs by Proton Magnetic Resonance.  
Biochemistry 7, (1968), 3052 - 3062
- 116.) Sarma, R. H., N. O. Kaplan: High Frequency Nuclear Magnetic Resonance. Study of the M and P Helices of Reduced Pyridine Dinucleotides.  
Biochemistry, 9, (1970), 539 - 548

- 117.) Sarma, R.H., M. Moore, N.O. Kaplan:  
Investigation of the Configuration and Con-  
formation of N-Methyl-N-ethyl-nicotinamide-  
Adenine Dinucleotide by Nuclear Magnetic  
Resonance Spectroscopy.  
Biochemistry 9, (1970), 549 - 556
- 118.) Sarma, R.H., N.O. Kaplan: High Frequency  
Nuclear Magnetic Resonance Investigation  
of the Backbone of Oxidized and Reduced  
Pyridine Nucleotides.  
Biochemistry 9, (1970) 557 - 564
- 119.) Blomquist, C.H : The Effect of Denterium Oxide on  
the Fluorescence of reduced Nicotinamide  
Adenine Dinucleotide free in solution and in  
complexes with Liver Alcohol Dehydrogenase.  
J. biol. Chem. 244, (1969), 1605 - 1607
- 120.) Velick, S.F.: Light and Life, p. 108  
Eds.: W.D. McElroy and B. Glass,  
John Hopkins Press, Baltimore (1961)
- 121.) Hollis, D.P.: A nuclear Magnetic Resonance Study  
of Substrate Binding by Alcohol Dehydrogenases.  
Biochemistry 6, (1967), 2080 - 2087
- 122.) Catterall, W.A., D.P. Hollis, Ch.F. Walter:  
Nuclear Magnetic Resonance Study of the  
Conformation of Nicotinamide-Adenine  
Dinucleotide and reduced Nicotinamide-Adenine  
Dinucleotide in Solution.  
Biochemistry 8, (1969), 4032 - 4036

- 123.) Karrer, P., G. Schwarzenbach, F. Benz,  
U. Solmssen: Über Reduktionsprodukte des  
Nicotinsäure-amid-jodmethylats.  
Helv. Chim. Acta 19, (1936), 811 - 828
- 124.) Karrer, P., B.H. Ringier, J. Büchi, H. Fritzsche,  
U. Solmssen: 5. Modellversuche betreffend  
die wasserstoffübertragenden Wirkungsgruppen  
der Cofermente.  
Helv. Chim. Acta 20, (1937), 55 - 71
- 125.) Karrer, P., B.H. Ringier: Reduktionswirkungen des  
N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids und  
analoger Verbindungen.  
Helv. Chim. Acta 20, (1937), 622 - 625
- 126.) Karrer, P., F.J. Stare: N-Alkyl-o-dihydro-nicotin-  
säure-amide.  
Helv. Chim. Acta 20, (1937), 418 - 423
- 127.) Wallenfels, K., M. Gellrich, F. Kubowitz: Über den  
Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit  
Pyridinnucleotiden. X. Weitere Cozymase-Modelle  
und ein DPN-Analogon.  
Liebigs Ann. Chem. 621, (1959), 137 - 148
- 128.) Fairfull, A.E.S., J.L. Lowe, D.A. Peak: A convenient  
reagent for the preparation of Thioamides, and  
the Thiohydrolysis of S-Alkyl-isothiourea  
Derivatives.  
J. chem. Soc. (London), (1952), 742 - 744

- 129.) R  th, C., G Prange:   ber eine neue Synthese der  
2-Amino-nicotinsäure und ihr Verhalten gegen  
Salpetersäure.  
III. Mitteilung über Derivate des Pyridins und  
Chinolins.  
Liebigs Ann. Chem. 467, (1928), 1 - 10
- 130.) Caldwell, W.T., F.T Tyson, L. Lauer: Substituted  
2-Sulfonamido-5-aminopyridines. II.  
J. Am. Chem. Soc. 66, (1944), 1479 - 1484
- 131.) Gregory, P.Z., S.J. Holt, R. Slack: The Search for  
Chemotherapeutic Amidines. Part VI. Pyridines.  
J. Chem. Soc. 1947, 87 - 89
- 132.) Friedman, L., H. Shechter: Dimethylformamide as a  
useful solvent in preparing Nitriles from  
Aryl Halides and cuprous cyanide; improved  
isolation techniques.  
J. Org. Chem. 26, (1961), 2522 - 2524
- 133.) Russo, F.: Derivati della Thiourea Piridil-e Benzo-  
tiazolil-sostituiti.  
Bolletino Chimico Farmaceutico 100, (1961),  
252 - 256
- 134.) Walter, W., K.-D. Bode: Neuere Methoden der pr  -  
parativen organischen Chemie.  
IV. Synthesen von Thiocarbonsäureamiden.  
Angew. Chem. 78, (1966), 517 - 532  
-   bersichtsarbeit -

- 135.) Walter, W., J. Curts: Oxydationsprodukte von Thiocarbonsäureamiden.  
III. Oxydationsprodukte primärer Thioamide.  
Chem. Ber. 93, (1960), 1511 - 1517
- 136.) Gardner, Th.S., E. Wenis, J. Lee: Synthesis of Compounds for Chemotherapy of Tuberculosis.  
VII. Pyridine N-Oxides with Sulfur-Containing Groups.  
J. Org. Chem. 22, (1957), 984 - 986
- 137.) Sarantakis, D., J.K. Sutherland, C. Tortorella, V. Tortorella: 2-Fluoropyridine N-Oxide and its Reactions with Aminoacid Derivatives.  
J. Chem. Soc. (C) (1968), 72 - 73
- 138.) Taylor, jr., E.C., A.J. Crovetti: Pyridine-1-oxides. I. Synthesis of some nicotinic acid derivatives.  
J. Org. Chem. 19, (1954), 1633 - 1640
- 139.) Ochiai, E.: Recent Japanese work on the Chemistry of Pyridine 1-Oxide and related compounds.  
J. Org. Chem. 18, (1953), 534 - 551
- 140.) Ochiai, E.: Aromatic Amine Oxides.  
Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York (1967), 24
- 141.) Jensen, K.A., P.H. Nielsen: Infrared Spectra of Thioamides and Selenoamides.  
Acta chem. Scand. 20, (1966), 597 - 629

- 142.) Walter, W., H.P. Kubersky, D. Ahlquist: Über die Struktur der Thioamide und ihrer Derivate.  
IX. Untersuchungen zum Problem der Thionamid/Thiolimid-Tautomerie bei Pyridin-carbonsäurethioamiden.  
Liebigs Ann. Chem. 733, (1970), 170 - 176
- 143.) Harvey, A.B., M.K. Wilson: Vibrational Spectrum of Methane-selenol.  
J. chem. Phys. 45, (1966) 678 - 688
- 144.) Staab, H. A.: Einführung in die theoretische organische Chemie.  
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße  
4. Auflage (1966), 274
- 145.) Borsdorf, R., M. Scholz: Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie, S. 101  
Akademie-Verlag, Berlin (1968)
- 146.) Ruwet, A., M. Renson: Etude du spectre IR des Thio-1 et Séléno-1 Coumarines et des dérivés Thio-2 correspondants.  
Comparaison avec les Thio-1 et Séléno-1 chromones isomères.  
Bull. Soc. Chim. Belges 79, (1970), 89 - 101
- 147.) Shindo, H.: Studies on the Infrared Spectra of Heterocyclic compounds. IV. Infrared Spectra of Monosubstituted Pyridine Derivatives.  
Pharm. Bull. (Tokyo), 5, (1957), 472 - 484

- 148.) Shindo, H. : Studies on the Infrared Spectra of  
Heterocyclic compounds.  
V. Infrared Spectra of Substituted Pyridine  
1-Oxides.  
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 6, (1958), 117-129
- 149.) Fausler, B., J.M. Lowenstein: Aconitase from  
Pig Heart. - in "Methods in Enzymology",  
Vol. XIII, p. 26 - 30,  
Eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan,  
Academic Press, New York and London (1969)
- 150.) Kai, M., J.G. Salway, J.N. Hawthorne: The Di-  
phosphoinositide Kinase of Rat Brain.  
Biochem. J. 106, (1968), 791 - 801
- 151.) Kai, M., G.L. White, J.N. Hawthorne: The Phosphat-  
idylinositol Kinase of Rat Brain.  
Biochem. J. 101, (1966), 328 - 337
- 152.) Brunnemann, A., H. Coper: Hydrolyse von NAD(P)  
und Biosynthese von 3-APAD(P) durch Hirn-  
mikrosomen verschiedener Tierarten.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.  
Pharmak. 250, (1965), 469 - 478
- 153.) Coper, H. : Untersuchungen über die NAD(P)-Glyco-  
hydrolase-Aktivität in menschlichen Hirntu-  
moren.  
Z. Krebsforsch. 70, (1967), 172 - 177

- 154.) Coper, H., H. Hadass: Induktion der NAD(P)-Glykohydrolase im DS-Carcinomsarkom der Ratte durch Cyclophosphamid.  
Z. Krebsforsch. 70, (1968), 281 - 286
- 155.) Coper, H., I. Helge, H. Herken: Über die Wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DPN- und TPN-Nucleosidase des Gehirns.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 243, (1962), 99 - 112
- 156.) Caldwell, J. C.: Ion-exchange Chromatography of Tissue Nucleotides.  
- Übersichtsarbeit -  
J. Chromatog. 44, (1969), 331 - 341
- 157.) Silverstein, E.: Separation and Purification of Oxidized and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotides.  
Anal. Biochem. 12, (1965), 199 - 212
- 158.) Ziporin, Z. Z., R. W. Hanson: A Chromatographic Procedure for the Separation and Detection of Pyridine Nucleotides and related compounds from Tissue Extracts.  
Anal. Biochem. 14, (1966), 78 - 86
- 159.) Hurlbert, R. B., H. Schmitz, A. F. Brumm, V. R. Potter: Nucleotide metabolism.  
II. Chromatographic Separation of Acid-soluble Nucleotides.  
J. biol. Chem. 209, (1954), 23 - 39

- 160.) Koransky, W.: Trennung und Bestimmung der  
Nucleotide des Gehirns.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.  
Pharmak. 234, (1958), 46 - 65
- 161.) Anderson, N.G., J.G. Green, M.L. Barber,  
F.C. Ladd: Analytical Techniques for Cell-  
Fractions.  
III. Nucleotides and related Compounds.  
Anal. Biochem. 6, (1963), 153 - 169
- 162.) Ingle, J.: A method for the improved separation  
of soluble nucleotides by ion-exchange  
chromatography.  
Biochim. Biophys. Acta 61, (1962), 147 - 149
- 163.) Determann, H.: Gelchromatographie. - Ein Labo-  
ratoriumsbuch.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New  
York (1967)
- 164.) Gelotte, B.: Studies on Gel Filtration. Sorption  
Properties of the Bed Material Sephadex.  
J. Chromatog. 3, (1960), 330 - 342
- 165.) Christ, W., D. Schmidt, H. Coper: Gel filtration  
behaviour of sulphur and selenium-containing  
nicotinamide-analogues on Sephadex G-25.  
J. Chromatog. 51, (1970), 537 - 538
- 166.) P-L Biochemicals (formerly Pabst Laboratories):  
Ultraviolet Absorption Spectra of Pyridine  
Nucleotide Coenzymes and Coenzyme Analogs.  
Circular OR-18 (Fourth Printing, 1968)

- 167.) Cramer, F.: Papierchromatographie.  
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße,  
5. Auflage (1962)
- 168.) Dave, K.G., R.B. Dunlap, M.K. Jain, E.H. Cordes,  
E. Wenkert: Highly reduced analogues of the  
Pyridine Nucleotide Coenzymes.  
J. biol. Chem. 243, (1968), 1073 - 1074
- 169.) Keil, B., Z. Šormová: Laboratoriumstechnik für Bio-  
chemiker.  
Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1965)
- 170.) Silverstein, E.: Separation of  $\text{NAD}^+$  and NADH and  
 $\text{NADP}^+$  and NADPH by anion exchange on  
DEAE-cellulose paper.  
Biochim. Biophys. Acta 215, (1970), 205 - 206
- 171.) Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie - Ein Laborato-  
riumshandbuch.  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,  
2. Auflage (1967)
- 172.) Randerath, K.: Dünnschicht-Chromatographie von Nucleo-  
tiden.  
Angew. Chem. 74, (1962), 484 - 488
- 173.) Clotten, R., A. Clotten: Hochspannungselektrophorese.  
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1962), S. 62,  
475 - 480

- 174.) Schaefer, J., G. Pooek: Trennung von Nucleotiden und anderen Phosphorsäureestern aus dem Herzmuskelextrakt der Ratte mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 236, (1959), 483 - 491
- 175.) Silver, M.J., J. Rodalewicz, Y. Duglas, D. Park: High-Voltage Paper Electrophoresis of Nucleotides.  
Anal. Biochem. 36, (1970), 525 - 527
- 176.) Berenblum, I., E. Chain: An improved method for the colorimetric determination of phosphate.  
Biochem. J. 32, (1938), 295 - 298
- 177.) Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 258, (1939), 117 - 120
- 178.) Barnum, C.P., C.W. Nash, E. Jennings, O. Nygard, H. Vermund: The separation of pentose and deoxypentose nucleic acids from isolated mouse liver cell nuclei.  
Arch. Biochem. 25, (1950), 376  
zitiert nach Schabarek, A. (68a)
- 179.) Dische, Z.: Color Reactions of Carbohydrates - in "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. 1, 478 - 514  
- Übersichtsartikel - Eds. R.L. Whistler, M.L. Wolfrom, Academic Press, New York and London (1962)

- 180.) Holzer, H., D. Busch, H. Kröger: Enzymatisch-optische Bestimmung von TPNH und TPN neben DPNH und DPN.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 313, (1958), 184 - 193
- 181.) Garcia-Bunuel, L., D.B. McDougal, H.B. Burch, E.M. Jones, E. Tonhill: Oxidized and reduced pyridine nucleotide levels and enzyme activities in brain and liver of niacin deficient rats.  
J. Neurochem. 9, (1962), 589 - 594
- 182.) Sokal, J.A., S. Tarkowski, T. Wronska-Nofer: A simplified method for determination of Nicotinamide Adenine Dinucleotides in Liver Tissue.  
Acta Biochimica Polonica 16, (1969), 1 - 10
- 183.) Klingenberg, M.: Diphospho-pyridinnucleotid. Reduziertes Diphospho-pyridinnucleotid. Triphospho-pyridinnucleotid. Reduziertes Triphospho-pyridinnucleotid.  
in H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", S 528 - 538  
Verlag Chemie (1962)
- 184.) Siegel, J.M., G.A. Montgomery, R.M. Bock: Ultraviolet Absorption Spectra of DPN and Analogs of DPN.  
Arch. Biochem. Biophys. 82, (1959), 288 - 299

- 185.) Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica Katalog,  
Coenzyme und Substrate (1967)
- 186.) Gutfreund, H.: An introduction to the study of  
Enzymes.  
- Handbuch -  
Blackwell Scientific Publications, Oxford,  
Revised Reprint 1967
- 187.) Leyden Webb, J.: Enzyme and Metabolic Inhibitors.  
Vol. I, General Principles of Inhibition.  
Academic Press, New York and London (1963)
- 188.) Lumper, L.: Grundlagen der Kinetik enzymatisch  
katalysierter Reaktionen - in Hoppe-Seyler/  
Thierfelder "Handbuch der Physiologisch- und  
Pathologisch-Chemischen Analyse."  
10. Auflage, 6. Band, Teil A. 17 - 55  
Springer Verlag, Berlin (1964)
- 189.) Michaelis, L., Maud L. Menten: Die Kinetik der  
Invertinwirkung.  
Biochem. Z. 49, (1913), 333 - 369
- 190.) Lineweaver, H., D. Burk: The Determination of  
Enzyme Dissociation Constants.  
J. Am. Chem. Soc. 56, (1934), 658 - 666
- 191.) Eadie, G.S.: The Inhibition of Cholinesterase by  
Physostigmine and Prostigmine.  
J. biol. Chem. 146, (1942), 85 - 93

- 192.) Hofstee, B.H.J.: On the Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxidase by the Substrate Xanthine.  
J. biol. Chem. 216, (1955), 235 - 244
- 193.) --- : Graphical Analysis of Single Enzyme Systems.  
Enzymologia 17, (1954 - 1956), 273 - 278
- 194.) Dalziel, K.: Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms.  
Acta Chem. Scand. 11, (1957) 1706 - 1723
- 195.) Dalziel, K.: Kinetics - in "Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases"  
Editor H. Sund, Springer Verlag, Berlin,  
3 - 13, (1970),
- 196.) Engel, P. C., K. Dalziel: Kinetics and Mechanism of glutamate Dehydrogenase.  
ibid. 245 - 256
- 197.) Augustinsson, K B.: Acta Physiol. Scand. 15, (1948),  
Suppl. 52  
zitiert nach Leyden Webb (187)
- 198.) Dixon, M.: The Effect of pH on the Affinities of Enzymes for Substrates and Inhibitors.  
Biochem. J. 55, (1953) 161 - 170
- 199.) --- : The Determination of Enzyme Inhibitor Constants.  
Biochem. J. 55, (1953), 170 - 171

- 200.) Hunter, A., C.E. Downs: The Inhibition of Arginase  
by Amino Acids.  
J. biol. Chem. 157, (1945), 427 - 446
- 201.) Schenker, K., J. Druey: 214. Heilmittelchemische  
Studien in der heterocyclischen Reihe.  
Hydropyridine I. Die Reduktion von 1-Methyl-  
3-cyanpyridiniumjodid mit Natriumborhydrid.  
Helv. Chim. Acta 42, (1959), 1960 - 1970
- 202.) Abelson, D., A. Boyle, H. Seligson: Identification  
of N'-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide in  
Human Plasma.  
J. biol. Chem. 238, (1963), 717 - 718

## Lebenslauf

Am 21. 3. 1939 wurde ich als Sohn des späteren Professors für Systematische Pädagogik, Franz-Xaver Christ und seiner Ehefrau Franziska geb. Böhner in Tübingen/Neckar geboren.

Im Herbst 1944 wurde ich in die Volksschule in Laupheim (Württemberg) eingeschult und wechselte 1948 auf das dortige Gymnasium.

Seit 1954 besuchte ich das Kepler-Gymnasium in Ulm/Donau, wo ich am 2. März 1957 die Reifeprüfung bestand.

Von 1957 bis 1961 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen Chemie (ab 1961 zusätzlich Medizin). Am 18. Mai 1961 bestand ich das Vordiplom in Chemie und am 28. Okt. 1961 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung in Medizin.

Im Wintersemester 1961/62 setzte ich meine Studien an der Freien Universität Berlin fort, wo ich am 25. Nov. 1964 die Diplom-Hauptprüfung in Chemie ablegte.

Von Januar 1965 bis 18. Mai 1966 fertigte ich meine Diplomarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin an. Seit Juni 1966 arbeite ich unter der Anleitung von Prof. H. Coper an meiner Dissertation, zunächst im Pharmakologischen Institut, dann im Institut für Neuropsychopharmakologie der Freien Universität Berlin.

Meine akademischen Lehrer waren

in T Ü B I N G E N:

Schweizer (Mathematik)

Krüger (Physik)

Rüdorff und Brodersen (Anorganische Chemie)

Eugen Müller, Hellmann und Opitz (Organische Chemie)

Kortüm (Physikalische Chemie)

Nultsch (Botanik)

Möhres (Zoologie)

Tonutti (Anatomie)

in B E R L I N:

Lautsch, Broser, Manecke (Organische Chemie)

Schenk, Jahr (Anorganische Chemie)

Plieth, Vetter, Hirschwald (Physikalische Chemie)

Schütte, Riemschneider (Physiologische Chemie)

Küster, Eckardt (Botanik)

Schmidt, Großgebauer (Mikrobiologie)



